

**NEW CARBONYL REDUCTASE, POLYNUCLEOTIDE COMPRISING DNA
ENCODING THE ENZYME, METHOD FOR PRODUCING THE AND METHOD FOR
PRODUCING OPTICALLY ACTIVE ALCOHOL UTILIZING THE SAME**

Publication number: JP2005000002

Publication date: 2005-01-06

Inventor: KIMOTO KUNIHIRO; YAMAMOTO HIROAKI;
NAKAJIMA MASANORI

Applicant: DAICEL CHEM

Classification:

- International: C12N15/09; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21;
C12N5/10; C12N9/02; C12N9/04; C12P7/02; C12P7/22;
C12N15/09; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21;
C12N5/10; C12N9/02; C12N9/04; C12P7/02; (IPC1-7):
C12N15/09; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21;
C12N5/10; C12N9/02; C12P7/02; C12P7/22

- european: C12N9/04; C12P7/22

Application number: JP20030163015 20030606

Priority number(s): JP20030163015 20030606; JP20030113402 20030417

Also published as:



EP1469079 (A1)

US7083962 (B2)

US2005148057 (A)

Report a data error he

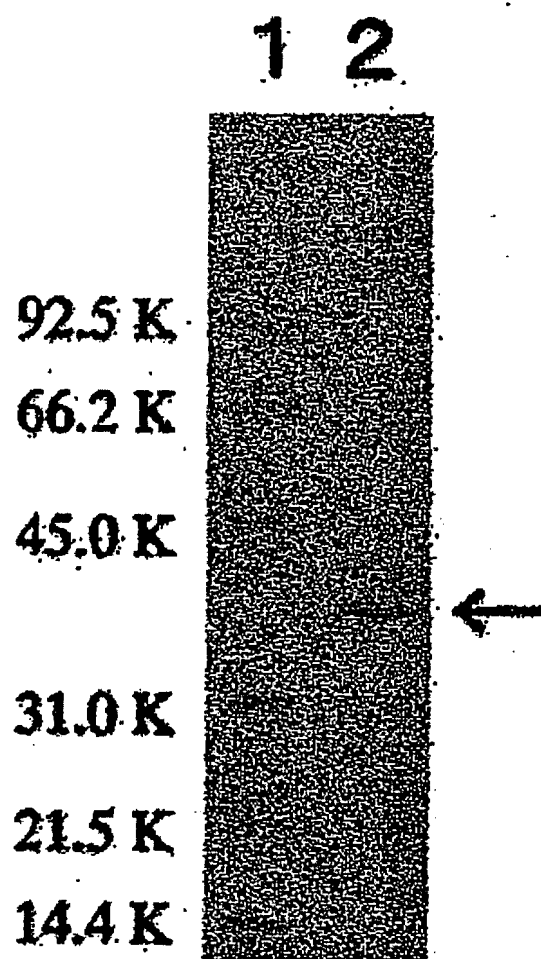
Abstract of JP2005000002

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for production with which a product of high optical purity can be obtained in good yield in producing (S)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propanol and to provide a new reductase producing the (S)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propanol of the high optical purity by reducing 3,4-dimethoxyphenylacetone using NADPH (reduced form [beta]-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) as a coenzyme.

SOLUTION: It is found that an enzyme reducing the 3,4-dimethoxyphenylacetone present in *Torulaspora delbrueckii* is a new carbonylreductase reducing various carbonyls. In addition, it is found that the enzyme reduces the 3,4-dimethoxyphenylacetone in a reduction reaction to produce the (S)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2-propanol of the high optical purity in high yield. Furthermore, a DNA encoding the enzyme is isolated to produce a recombinant bacterium highly expressing the enzyme.

COPYRIGHT: (C)2005,JPO&NCIPI

FIG. 1



Data supplied from the *esp@cenet* database - Worldwide

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2005-2

(P2005-2A)

(43) 公開日 平成17年1月6日(2005.1.6)

(51) Int. Cl. ⁷

F 1

テーマコード (参考)

C 1 2 N 15/00

C 1 2 N 15/00

A

4 B 0 2 4

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/15

4 B 0 5 0

C 1 2 N 1/19

C 1 2 N 1/19

4 B 0 6 4

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 1/21

4 B 0 6 5

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 9/02 Z N A

審査請求 未請求 請求項の数 13 O L (全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-163015 (P2003-163015)
 (22) 出願日 平成15年6月6日 (2003.6.6)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-113402 (P2003-113402)
 (32) 優先日 平成15年4月17日 (2003.4.17)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

(71) 出願人 000002901
 ダイセル化学工業株式会社
 大阪府堺市鉄砲町1番地
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100108774
 弁理士 橋本 一彦
 (72) 発明者 木本 訓弘
 茨城県つくば市千現1-14-14-40
 1
 (72) 発明者 山本 浩明
 茨城県つくば市千現1-14-14-10
 3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規なカルボニル還元酵素、その酵素をコードするDNAを含むポリヌクレオチド、その製造方法、およびこれを利用した光学活性アルコールの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 (S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造において、光学純度の高い生成物を収率良く与えることができる製造方法を提供することを課題とする。また、NADPHを補酵素として、3,4-ジメトキシフェニルアセトンを還元して、高い光学純度の(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する新規な還元酵素の提供を課題とする。

【解決手段】 トルラスポラ・デルブレッキー中に存在する3,4-ジメトキシフェニルアセトンを還元する酵素が様々なカルボニルを還元する新規なカルボニル還元酵素であることを見出し、本酵素が還元反応において3,4-ジメトキシフェニルアセトンを還元して高い収率で高い光学純度の(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成することを見出した。更に、本酵素をコードするDNAを単離し、本酵素を高発現する組換え菌を造成した。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

次の (1) および (2) に示す理化学的性状を有するカルボニル還元酵素。

(1) 作用

還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を補酵素として、ケトン還元し、光学活性アルコールを生成する。

(2) 基質特異性

(a) 還元反応の補酵素として還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を利用する。

(b) 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元して、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する。 10

(c) 3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに対して還元活性を有するが、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールに対して酸化活性を有しない。

【請求項 2】

更に付加的に、次の (3) および (4) に示す理化学的性状を有する請求項 1 に記載のカルボニル還元酵素。

(3) 至適 pH

pH 5.5-6.5。

(4) 分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および、ゲルろ過による分子量が約 38,000。 20

【請求項 3】

トルラスポラ属に属する微生物によって産生される請求項 1 に記載のカルボニル還元酵素。

【請求項 4】

トルラスポラ属に属する微生物がトルラスポラ・デルブレッキー (*Torulaspora delbrueckii*) である、請求項 3 に記載のカルボニル還元酵素。

【請求項 5】

下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号: 1 に記載された塩基配列を含むポリヌクレオチド 30

(b) 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド

【請求項 6】

請求項 1 の (1) および (2) に示す理化学的性状を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、下記 (c) から (e) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(c) 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号: 1 に記載された塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド 40

(e) 配列番号: 2 に記載のアミノ酸配列と 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

【請求項 7】

請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質。

【請求項 8】

請求項 5 または 6 に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター。

【請求項 9】

さらに補酵素再生用脱水素酵素遺伝子を含む請求項 8 に記載の組換えベクター。

【請求項 10】

請求項 5 もしくは 6 に記載のポリヌクレオチド、または請求項 8 もしくは 9 に記載の組換え 50

えベクターにより形質転換された形質転換体。

【請求項 11】

請求項 1 の (1) および (2) に示す理化学的性状を有し、かつ少なくとも 80% ee 以上の (S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する機能を有するタンパク質であって、下記 (a) から (c) のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含むカルボニル還元剤。

(a) 配列番号: 17、21、もしくは 25 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号: 16、20、もしくは 24 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、 10

(c) 配列番号: 17、21、もしくは 25 に記載のアミノ酸配列と 70% 以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 1～4 のいずれかに記載のカルボニル還元酵素、請求項 7 に記載のタンパク質、該酵素もしくはタンパク質を産生する微生物、該微生物の処理物、請求項 10 に記載の形質転換体、または請求項 11 に記載のカルボニル還元剤をケトンに作用させ、光学活性アルコールを製造することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法。

【請求項 13】

請求項 1～4 のいずれかに記載のカルボニル還元酵素、請求項 7 に記載のタンパク質、該酵素もしくはタンパク質を産生する微生物、該微生物の処理物、請求項 10 に記載の形質転換体、または請求項 11 に記載のカルボニル還元剤、を 3,4-ジメトキシフェニルアセトンに作用させ、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを製造することを特徴とする、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸（以下、NADPH と略す）依存性の新規なカルボニル還元酵素に関する。また本発明は、該酵素タンパク質をコードするポリヌクレオチド、該酵素の製造方法、該酵素を用いた (S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを製造する方法に関する。 30

【0002】

【従来の技術】

従来、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを製造する方法として、3,4-ジメトキシフェニルアセトンに微生物を作用させ還元する方法が知られている（特許文献 1 および 2 参照）。しかしながら、いずれも生成物濃度が 1% 以下と生産性が低い。そのため、経済的に優れ、且つ、簡便な方法で高い反応収率で光学純度の高い (S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを得る方法の確立が望まれていた。 40

【0003】

【特許文献 1】

特開平 8-325188 号公報

【0004】

【特許文献 2】

特開平 8-89261 号公報

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造において、光学純度の高い生成物を収率良く与えることができる製造方法を提供することを課 50

題とする。

また、本発明は、NADPHを補酵素として、3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元して、高い光学純度の(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する新規な酵素の提供を課題とする。更に本発明は、目的とする性状を備えた該酵素をコードするDNAを単離し、組換え体として得ることを課題とする。加えて、組換え体による(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造方法の提供をも課題とするものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、経済的に優れ、且つ、簡便な方法で光学純度の高い(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを得る方法として、立体選択的に3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元して(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する酵素を、異種微生物により高発現させ、得られた高活性な遺伝子組換え菌を用いて3, 4-ジメトキシフェニルアセトンから(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを効率的に生産する方法に着目したところ、トルラスポラ・デルブレッキー(*Torulaspora delbrueckii*)が高い反応収率と高い立体選択性を有していることを見出し、本菌株中に存在する3, 4-ジメトキシフェニルアセトンの還元に関与する酵素に関する研究を進めた結果、本菌株の無細胞抽出液から、3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元する酵素を電気泳動的に単一のバンドになるまで精製し、その諸性質を明らかにした。その結果、本酵素が様々なカルボニル還元する新規なカルボニル還元酵素であることを見出した。また、本酵素は還元反応において3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元して高い収率で高い光学純度の(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成した。

【0007】

更に、本酵素をコードするDNAを単離し、本酵素を高発現する組換え菌を造成し、本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のカルボニル還元酵素、この酵素をコードするDNAを含むポリヌクレオチド、この酵素の製造方法、および用途に関する。

【0008】

従来、3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元する酵素としては、フェニルアセトアルデヒド還元酵素(*Eur. J. Biochem.*, 269, 2394-2402 (2002))が知られている。本酵素はNADH依存的にケトン還元し、かつ、NAD依存的に2級アルコールに対して脱水素活性を有しており、本発明のカルボニル還元酵素とは性質が異なる。

【0009】

また、3, 4-ジメトキシフェニルアセトンと構造が類似した3, 4-メチレンジオキシフェニルアセトン還元する酵素としてチゴサッカロマイセス・ルーキシー(*Zygosaccharomyces rouxii*)が産生するketoreductase(*Eur. J. Biochem.*, 267, 5493-5501 (2000))が知られている。しかしながら、3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに対する活性および立体選択性は報告されていない。また、SDS-PAGEにおける分子量が42,000、至適pHが6.6-6.8、至適温度が37-39℃である、など本発明のカルボニル還元酵素とは性質が異なる。

【0010】

また、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を用いてSWISS-PROTを対象にBLAST programを用いてホモロジー検索を行った結果、本発明のカルボニル還元酵素にホモロジーを有するタンパク質が見出された。具体的には、サッカロマイセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のゲノム解析の結果より得られた4種類の予想ORFであり、それぞれYGL157w, YGL039w, YDR541c, YOL151wと命名されている。これらの内、YGL157w, YGL039w, YDR541cがコードするタンパク質は機能未知である。YOL151wは、J

. Am. Chem. Soc., 123 (8), 1547-1555 (2001)において種々のカルボニル化合物に対する還元活性が測定されているが、3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに対する活性は報告されていない。

【0011】

すなわち本発明は、以下の新規なカルボニル還元酵素、該酵素をコードするポリヌクレオチド、該酵素の製造方法、および該酵素を利用した光学活性アルコールの製造方法、およびその用途に関し、より具体的には、

〔1〕 次の（１）および（２）に示す理化学的性状を有するカルボニル還元酵素、

（１）作用

還元型β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を補酵素として、ケトン還元し、光学活性アルコールを生成する 10

（２）基質特異性

（a）還元反応の補酵素として還元型β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸を利用する

（b）3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元して、（S）-1-（3, 4-ジメトキシフェニル）-2-プロパノールを生成する

（c）3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに対して還元活性を有するが、（S）-1-（3, 4-ジメトキシフェニル）-2-プロパノールに対して酸化活性を有しない、

〔2〕 更に付加的に、次の（３）および（４）に示す理化学的性状を有する〔1〕に記載のカルボニル還元酵素、 20

（３）至適pH

pH 5.5-6.5。

（４）分子量

ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、および、ゲルろ過による分子量が約38,000。

〔3〕 トルラスポラ属に属する微生物によって産生される〔1〕に記載のカルボニル還元酵素、

〔4〕 トルラスポラ属に属する微生物がトルラスポラ・デルブレッキー (*Torula sporae delbrueckii*) である、〔3〕に記載のカルボニル還元酵素、

〔5〕 下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチド、 30

（a）配列番号：1に記載された塩基配列を含むポリヌクレオチド

（b）配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド

〔6〕 〔1〕の（１）および（２）に示す理化学的性状を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、下記（c）から（e）のいずれかに記載のポリヌクレオチド、

（c）配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（d）配列番号：1に記載された塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド 40

（e）配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

〔7〕 〔5〕または〔6〕に記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質

〔8〕 〔5〕または〔6〕に記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクター、

〔9〕 さらに補酵素再生用脱水素酵素遺伝子を含む〔8〕に記載の組換えベクター、

〔10〕 〔5〕もしくは〔6〕に記載のポリヌクレオチド、または〔8〕もしくは〔9〕に記載の組換えベクターにより形質転換された形質転換体、

〔11〕 〔1〕の（１）および（２）に示す理化学的性状を有し、かつ少なくとも80 50

% e e 以上の (S) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - プロパノールを生成する機能を有するタンパク質であって、下記 (a) から (c) のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含むカルボニル還元剤、

(a) 配列番号: 17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号: 16、20、もしくは24に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号: 17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

10

[12] トルラスポラ属に属し、[1]に記載の酵素を産生する微生物を培養する工程を含む、[1]に記載の酵素の製造方法、

[13] トルラスポラ属に属する微生物が、トルラスポラ・デルブレッキー (*Torulaspora delbrueckii*) である[12]に記載の製造方法、

[14] 下記 (a) から (e) のいずれかに記載のポリヌクレオチドを含む組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養する工程、を含む[9]に記載のカルボニル還元剤の製造方法、

(a) 配列番号: 16、20、もしくは24に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号: 17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

20

(c) 配列番号: 17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号: 16、20、もしくは24に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号: 17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

[15] [1] ~ [4] のいずれかに記載のカルボニル還元酵素、[7]に記載のタンパク質、該酵素もしくはタンパク質を産生する微生物、該微生物の処理物、[10]に記載の形質転換体、または[11]に記載のカルボニル還元剤をケトンに作用させ、光学活性アルコールを製造することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法、

30

[16] [1] ~ [4] のいずれかに記載のカルボニル還元酵素、[7]に記載のタンパク質、該酵素もしくはタンパク質を産生する微生物、該微生物の処理物、[10]に記載の形質転換体、または[11]に記載のカルボニル還元剤、を3, 4 - ジメトキシフェニルアセトンに作用させ、(S) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - プロパノールを製造することを特徴とする、(S) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - プロパノールの製造方法、を提供するものである。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明によるカルボニル還元酵素は、補酵素としてNADPHを利用しうること、アルコールに対して脱水素活性を有しないこと、また、NADPHを補酵素として3, 4 - ジメトキシフェニルアセトンを還元し、90% e e 以上の (S) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - プロパノールを生成することによって特徴付けられる。

40

【0013】

本発明において、3, 4 - ジメトキシフェニルアセトンに対する還元活性は、例えば、次のようにして確認することができる。

・ 3, 4 - ジメトキシフェニルアセトンに対する還元活性測定法:

50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、0.2 mM NADPH、5 mM 3, 4 - ジメトキシフェニルアセトンおよび酵素を含む反応液中30℃で反応させ、NADPHの減少にともなう340 nmの吸光度の減少を測定する。1 Uは、1分間に1 μmo

50

1のNADPHの減少を触媒する酵素量とした。

【0014】

上記のような理化学的性状を持つカルボニル還元酵素は、例えばトルラスポラ属の酵母の培養物より精製することができる。特に、トルラスポラ・デルブレッキー (*Torula delbrueckii*) が本発明によるカルボニル還元酵素の産生能に優れる。本発明のカルボニル還元酵素を得るために利用することができるトルラスポラ・デルブレッキーとしては、IFO 0381、JCM 5921などが挙げられる。

【0015】

上記微生物は、YM培地等の酵母の培養に用いられる一般的な培地で培養される。十分に増殖させた後に菌体を回収し、2-メルカプトエタノールやフェニルメタンフルホニルフルオリド等の還元剤やプロテアーゼ阻害剤を加えた緩衝液中で破碎して無細胞抽出液とする。無細胞抽出液から、タンパク質の溶解度による分画（有機溶媒による沈澱や硫酸などによる塩析など）や、陽イオン交換、陰イオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィーや、キレート、色素、抗体などを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを適宜組み合わせることにより精製することができる。例えば、フェニルセファロースを用いた疎水クロマトグラフィー、Mono Qを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー、ブチルセファロースを用いた疎水クロマトグラフィー、ハイドロキシアパタイトを用いた吸着クロマトグラフィー等を経て電気泳動的に単一バンドにまで精製することができる。

【0016】

トルラスポラ・デルブレッキーに由来する本発明のカルボニル還元酵素は、以下の理化学的性状(1)、(2)を備えたタンパク質である。

(1) 作用

NADPHを補酵素として、ケトン還元し、光学活性アルコールを生成する。

(2) 基質特異性

(a) 還元反応の補酵素としてNADPHを利用する。

(b) 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元して、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する。

(c) 3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに対して還元活性を有するが、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールに対して酸化活性を有しない。

【0017】

また、本発明のカルボニル還元酵素は、更に付加的に、次の(3)、(4)に示す理化学的性状を有することが好ましい。

(3) 至適pH

pH 5.5-6.5。

(4) 分子量

SDS-PAGE、および、ゲルろ過による分子量が約38,000。

【0018】

本発明は、カルボニル還元酵素をコードするポリヌクレオチドおよびそのホモログに関する。本発明において、ポリヌクレオチドは、DNAやRNA等の天然のポリヌクレオチドに加え、人工的なヌクレオチド誘導体を含む人工的な分子であることもできる。また本発明のポリヌクレオチドは、DNA-RNAのキメラ分子であることもできる。本発明のカルボニル還元酵素をコードするポリヌクレオチドは、例えば配列番号：1に示す塩基配列を含む。配列番号：1に示す塩基配列は、配列番号：2に示すアミノ酸配列を含むタンパク質をコードしており、このアミノ酸配列を含むタンパク質は、本発明によるカルボニル還元酵素の好ましい態様を構成する。

【0019】

本発明のカルボニル還元酵素をコードするポリヌクレオチドのホモログとは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列を含み、かつ、前記理化学的性状(1)-(2)を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。当業者であれば、配列番号：1記載のポリヌ

クレオチドに部位特異的変異導入法 (Nucleic Acid Res. 10, pp. 6487 (1982), Methods in Enzymol. 100, pp. 448 (1983), Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), PCR A Practical Approach IRL Press pp. 200 (1991)) などを用いて、適宜置換、欠失、挿入、および/または付加変異を導入することによりポリヌクレオチドのホモログを得ることが可能である。

【0020】

また、本発明におけるポリヌクレオチドのホモログは、配列番号：1に示される塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズできるポリヌクレオチドであって、かつ、前記理化学的性状(1)-(2)を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドも含む。ストリンジェントな条件でハイブリダイズできるポリヌクレオチドとは、配列番号：1に記載中の任意の少なくとも20個、好ましくは少なくとも30個、例えば40、60または100個の連続した配列を一つまたは複数選択したDNAをプローブDNAとし、例えばECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、マニュアルに記載の条件(例えば、wash: 42℃、0.5x SSCを含むprimary wash buffer)において、ハイブリダイズするポリヌクレオチドを指す。より具体的な「ストリンジェントな条件」とは、例えば、通常、42℃、2x SSC、0.1% SDSの条件であり、好ましくは50℃、2x SSC、0.1% SDSの条件であり、さらに好ましくは、65℃、0.1x SSCおよび0.1% SDSの条件であるが、これらの条件に特に制限されない。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで最適なストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0021】

さらに、本発明におけるポリヌクレオチドのホモログは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%以上のホモロジーを有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを含む。タンパク質のホモロジー検索は、例えばSWISS-PROT, PIR, DADなどのタンパク質のアミノ酸配列に関するデータベースや DDBJ, EMBL,あるいはGene-BankなどのDNA配列に関するデータベース、DNA配列を元にした予想アミノ酸配列に関するデータベースなどを対象に、BLAST, FASTAなどのプログラムを利用して、例えば、インターネットを通じて行うことができる。

【0022】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列を用いてDADを対象にBLASTプログラムを用いてホモロジー検索を行った結果、既知のタンパク質の中で高いホモロジーを示したのは、サッカロマイセス・セレビジエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の産生するYOL151w (61%)、チゴサッカロマイセス・ルーキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) が産生するketoreductase (45%)であった。本発明の70%以上のホモロジーとは、例えば、Lipman-Pearson法 (Science, 227, 1435-1441 (1985)) によるプログラムを用いて計算した値を表す。

【0023】

即ち本発明の好ましい態様においては、上記(1)および(2)に示す理化学的性状を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドであって、下記(c)から(e)のいずれかに記載のポリヌクレオチド、並びに本発明のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を提供する。

【0024】

(c) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、

10

20

30

40

50

欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(d) 配列番号：1に記載された塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

(e) 配列番号：2に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド

【0025】

また、このBLAST検索において、本発明のカルボニル還元酵素にホモロジーを有する機能未知の予想オープンリーディングフレーム(ORF)が見いだされた。具体的には、サッカロマイセス・セレビジエ(*Saccharomyces cerevisiae*)のゲノム解析の結果より得られた3種類の予想ORFであり、それぞれYGL157w, YGL039w, YDR541cと命名されている。これらの予想アミノ酸配列の本発明のカルボニル還元酵素に対するホモロジーは、57%、56%、61%であった。これらの予想タンパク質が本発明のカルボニル還元酵素活性を有するか否かを明らかにするために、DDBJに登録されているDNA配列を基にプライマーを合成し、サッカロマイセス・セレビジエのゲノムDNAより予想ORF部分をPCRクローニングした。各ORFを発現ベクターに導入し、大腸菌を形質転換して得られた形質転換株を培養して、それぞれのタンパク質を発現させた結果、YGL157w, YGL039w, YDR541cは、予想通りカルボニル還元活性を示した。また、これらのホモログは還元反応において3, 4-ジメトキシフェニルアセトンを還元して高い光学純度の(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成した。

【0026】

すなわち、配列番号：17、21、25に記載のアミノ酸配列を含むタンパク質は、本発明のカルボニル還元酵素のホモログの好ましい態様を表す。これらのタンパク質は、そのORFは公知であったものの、その機能はこれまでのところ未知であった。本発明者らによって、これらのタンパク質がカルボニル還元酵素であることが初めて示唆された。これらのタンパク質は、カルボニル還元剤として、例えば、光学活性アルコール(例えば、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノール等)の製造に利用することが可能であり非常に有用なものである。上記タンパク質のカルボニル還元剤としての用途は、本発明者らによって初めて見出されたものである。

【0027】

従って本発明の好ましい態様としては、上記(1)および(2)に示す理化学的性状を有するタンパク質であって、下記(a)から(e)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含むカルボニル還元剤を提供する。

【0028】

(a) 配列番号：16、20、もしくは24に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(d) 配列番号：16、20、もしくは24に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(e) 配列番号：17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【0029】

本発明のさらに好ましい態様においては、上記(1)および(2)に示す理化学的性状を有し、かつ少なくとも80%以上の(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを生成する機能を有するタンパク質であって、下記(a)から(c)のいずれかに記載のポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質を含むカルボニル還元

元剤を提供する。

【0030】

(a) 配列番号：17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および/または付加したアミノ酸からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチド、

(b) 配列番号：16、20、もしくは24に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド、

(c) 配列番号：17、21、もしくは25に記載のアミノ酸配列と70%以上の相同性を有するアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

【0031】

本発明は、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質に関する。本発明はまた、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質のホモログを含む。

【0032】

本発明のカルボニル還元酵素のホモログとは、配列番号：2に記載のアミノ酸配列に1もしくは複数のアミノ酸が欠失、置換、挿入および/または付加されたアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等なタンパク質を意味する。本発明において、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と機能的に同等とは、当該タンパク質が前記(1) - (2)に示した物理化学的性状を有することを意味する。当業者であれば、配列番号：1に記載のDNAに部位特異的変異導入法(Nucleic Acid Res. 10, pp. 6487 (1982), Methods in Enzymol. 100, pp. 448 (1983), Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989), PCR A Practical Approach IRL Press pp. 200 (1991))などを用いて、適宜置換、欠失、挿入、および/または付加変異を導入することによりカルボニル還元酵素のホモログをコードするポリヌクレオチドを得ることができる。そのカルボニル還元酵素のホモログをコードするポリヌクレオチドを宿主に導入して発現させることにより、配列番号：2に記載のカルボニル還元酵素のホモログを得ることが可能である。

【0033】

さらに、本発明のカルボニル還元酵素のホモログとは、配列番号：2に示されるアミノ酸配列と少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%以上のホモロジーを有するタンパク質をいう。タンパク質のホモロジー検索は、例えばSWISS-PROT, PIR, DADなどのタンパク質のアミノ酸配列に関するデータベースやDDBJ、EMBL、あるいはGene-BankなどのDNA配列に関するデータベース、DNA配列を元にした予想アミノ酸配列に関するデータベースなどを対象に、BLAST、FASTAなどのプログラムを利用して、例えば、インターネットを通じて行うことができる。

【0034】

本発明のカルボニル還元酵素をコードするポリヌクレオチドは、例えば、以下のような方法によって単離することができる。

【0035】

配列番号：1に記載の塩基配列を元にPCR用のプライマーを設計し、酵素生産株の染色体DNAもしくは、cDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行うことにより本発明のDNAを得ることができる。

【0036】

さらに、得られたDNA断片をプローブとして、酵素生産株の染色体DNAの制限酵素消化物をファージ、プラスミドなどに導入し、大腸菌を形質転換して得られたライブラリーやcDNAライブラリーを利用して、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーションなどにより、本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。

【0037】

また、PCRにより得られたDNA断片の塩基配列を解析し、得られた配列から、既知のDNAの外側に伸長させるためのPCRプライマーを設計し、酵素生産株の染色体DNAを適当な制限酵素で消化後、自己環化反応によりDNAを鋳型として逆PCRを行うことにより（Genetics 120, 621-623 (1988)）、また、RACE法（Rapid Amplification of cDNA End、「PCR実験マニュアル」p25-33, HBJ出版局）などにより本発明のポリヌクレオチドを得ることも可能である。

【0038】

なお本発明のポリヌクレオチドには、以上のような方法によってクローニングされたゲノムDNA、あるいはcDNAの他、合成によって得られたDNAが含まれる。 10

【0039】

このようにして単離された、本発明によるカルボニル還元酵素をコードするポリヌクレオチドを公知の発現ベクターに挿入することにより、カルボニル還元酵素発現ベクターが提供される。即ち本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターに関する。本発明の好ましい態様においては、本発明のポリヌクレオチドを含むベクターを提供する。本発明のベクターとしては、例えば、大腸菌における発現ベクターpSE420Dにカルボニル還元酵素をコードする遺伝子を発現可能に挿入した、pSE-TDR1、pSE-YDR1、pSE-YGP7、pSE-YGD9などが挙げられる。また、本発明の組換えベクターには、後述の補酵素再生用脱水素酵素遺伝子を含めることができる。 20

【0040】

また、この発現ベクターで形質転換した形質転換体を培養することにより、本発明のカルボニル還元酵素を組換え体から得ることができる。

【0041】

本発明においてカルボニル還元酵素を発現させるために、形質転換の対象となる微生物は、カルボニル還元酵素を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換えベクターにより形質転換され、カルボニル還元酵素活性を発現することができる生物であれば特に制限はない。本発明は、本発明のポリヌクレオチド、または本発明のベクターにより形質転換された形質転換体を提供する。本発明の形質転換体の対象となる微生物としては、例えば以下のような微生物を示すことができる。 30

- ・エシェリヒア（*Escherichia*）属
- ・バチルス（*Bacillus*）属
- ・シュードモナス（*Pseudomonas*）属
- ・セラチア（*Serratia*）属
- ・ブレヴィバクテリウム（*Brevibacterium*）属
- ・コリネバクテリウム（*Corynebacterium*）属
- ・ストレプトコッカス（*Streptococcus*）属
- ・ラクトバチルス（*Lactobacillus*）属など宿主ベクター系の開発されている細菌

- ・ロドコッカス（*Rhodococcus*）属
- ・ストレプトマイセス（*Streptomyces*）属など宿主ベクター系の開発されている放線菌

- ・サッカロマイセス（*Saccharomyces*）属
- ・クライベロマイセス（*Kluyveromyces*）属
- ・シゾサッカロマイセス（*Schizosaccharomyces*）属
- ・チゴサッカロマイセス（*Zygosaccharomyces*）属
- ・ヤロウイア（*Yarrowia*）属
- ・トリコスポロン（*Trichosporon*）属
- ・ロドスポリジウム（*Rhodospiridium*）属
- ・ピキア（*Pichia*）属

- ・キャンディダ (*Candida*) 属などの宿主ベクター系の開発されている酵母
- ・ノイロスポラ (*Neurospora*) 属
- ・アスペルギルス (*Aspergillus*) 属
- ・セファロスポリウム (*Cephalosporium*) 属
- ・トリコデルマ (*Trichoderma*) 属などの宿主ベクター系の開発されているカビ

【0042】

形質転換体の作製のための手順および宿主に適合した組み換えベクターの構築は、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる (例えば、Sambrookら、モレキュラー・クローニング、Cold Spring Harbor Laboratories)。微生物中などにおいて、本発明のNADPHを電子供与体とするカルボニル還元酵素遺伝子を発現させるためには、まず微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中にこのDNAを導入し、その遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。

【0043】

そのためには、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターを本発明のDNA鎖の5'-側上流に、より好ましくはターミネーターを3'-側下流に、それぞれ組み込めばよい。このプロモーター、ターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター、ターミネーターを用いる必要がある。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに関して「微生物学基礎講座8 遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては、Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)、Yeast 8, 423-488 (1992)、などに詳細に記述されている。

【0044】

例えばエシェリヒア属、特に大腸菌エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) においては、プラスミドベクターとして、pBR、pUC系プラスミドを利用でき、lac (β -ガラクトシダーゼ)、trp (トリプトファンオペロン)、tac、trc (lac、trpの融合)、 λ ファージ PL、PRなどに由来するプロモーターなどが利用できる。また、ターミネーターとしては、trpA由来、ファージ由来、rrnBリボソームRNA由来のターミネーターなどを用いることができる。これらの中で、市販のpSE420 (Invitrogen製) のマルチクローニングサイトを一部改変したベクターpSE420D (特開2000-189170に記載) が好適に利用できる。

【0045】

バチルス属においては、ベクターとしてpUB110系プラスミド、pC194系プラスミドなどが利用可能であり、染色体にインテグレートすることもできる。また、プロモーター、ターミネーターとしてapr (アルカリプロテアーゼ)、npr (中性プロテアーゼ)、amy (α -アミラーゼ) などが利用できる。

【0046】

シュードモナス属においては、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) などで宿主ベクター系が開発されている。トルエン化合物の分解に関与するプラスミドTOLプラスミドを基本にした広宿主域ベクター (RSF1010などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む) pKT240などが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとして、リパーゼ (特開平5-284973) 遺伝子などが利用できる。

【0047】

ブレヴィバクテリウム属特に、ブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) においては、pAJ43 (Gene 39, 281 (1985)) などのプラスミドベクターが利用可能である。プロモーター、ターミネーターとしては、大腸菌で使用されているプロモーター、ターミネーター

ーがそのまま利用可能である。

【0048】

コリネバクテリウム属、特にコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) においては、pCS1.1 (特開昭57-183799)、pCB101 (Mol. Gen. Genet. 196, 175 (1984)) などのプラスミドベクターが利用可能である。

【0049】

ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属においては、pHV1301 (FEMS Microbiol. Lett. 26, 239 (1985))、pGK1 (Appl. Environ. Microbiol. 50, 94 (1985)) などがプラスミドベクターとして利用可能である。 10

【0050】

ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属においては、ストレプトコッカス属用に開発された pAMB1 (J. Bacteriol. 137, 614 (1979)) などが利用可能であり、プロモーターとして大腸菌で利用されているものが利用可能である。

【0051】

ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属においては、ロドコッカス・ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) から単離されたプラスミドベクターが使用可能である (J. Gen. Microbiol. 138, 1003 (1992))。 20

【0052】

ストレプトマイセス (*Streptomyces*) 属においては、Hopwoodらの Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratories (1985) に記載の方法に従って、プラスミドを構築することができる。特に、ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) においては、pIJ486 (Mol. Gen. Genet. 203, 468-478, 1986)、pKC1064 (Gene 103, 97-99 (1991))、pUWL-KS (Gene 165, 149-150 (1995)) が使用できる。また、ストレプトマイセス・バージニア (*Streptomyces virginiae*) においても、同様のプラスミドを使用することができる (Actinomycetol. 11, 46-53 (1997))。 30

【0053】

サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、特にサッカロマイセス・セレビジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、YRp系、YE_p系、YC_p系、YIp系プラスミドが利用可能であり、染色体内に多コピー存在するリボソームDNAとの相同組み換えを利用したインテグレーションベクター (EP 537456など) は、多コピーで遺伝子を導入でき、かつ安定に遺伝子を保持できるため極めて有用である。また、ADH (アルコール脱水素酵素)、GAPDH (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素)、PHO (酸性フォスファターゼ)、GAL (β-ガラクトシダーゼ)、PGK (ホスホグリセレートキナーゼ)、ENO (エノラーゼ) などのプロモーター、ターミネーターが利用可能である。 40

【0054】

クライベロマイセス属、特にクライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) においては、サッカロマイセス・セレビジアエ由来2μm系プラスミド、pKD1系プラスミド (J. Bacteriol. 145, 382-390 (1981))、キラー活性に関与するpGK11由来プラスミド、クライベロマイセス属における自律増殖遺伝子KARS系プラスミド、リボソームDNAなどとの相同組み換えにより染色体中にインテグレート可能なベクタープラスミド (EP 537456な 50

ど)などが利用可能である。また、ADH、PGKなどに由来するプロモーター、ターミネーターが利用可能である。

【0055】

シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属においては、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来のARS (自律複製に関与する遺伝子) およびサッカロマイセス・セレビジアエ由来の栄養要求性を相補する選択マーカーを含むプラスミドベクターが利用可能である (*Mol. Cell. Biol.* 6, 80 (1986))。また、シゾサッカロマイセス・ポンベ由来のADHプロモーターなどが利用できる (*EMBO J.* 6, 729 (1987))。特に、pAUR224は、宝酒造から市販されており容易に利用できる。

10

【0056】

チゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*) においては、チゴサッカロマイセス・ロウキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来のpSB3 (*Nucleic Acids Res.* 13, 4267 (1985)) などに由来するプラスミドベクターが利用可能であり、サッカロマイセス・セレビジアエ由来 PHO5 プロモーターや、チゴサッカロマイセス・ロウキシ由来 GAP-Zr (グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素) のプロモーター (*Agri. Biol. Chem.* 54, 2521 (1990)) などが利用可能である。

【0057】

ピキア (*Pichia*) 属においては、ピキア・アンガスタ (旧名: ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)) において宿主ベクター系が開発されている。ベクターとしては、ピキア・アンガスタ由来自律複製に関与する遺伝子 (HARS1, HARS2) も利用可能であるが、比較的不安定であるため、染色体への多コピーインテグレーションが有効である (*Yeast* 7, 431-443 (1991))。また、メタノールなどで誘導されるAOX (アルコールオキシダーゼ)、FDH (ギ酸脱水素酵素) のプロモーターなどが利用可能である。また、ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) などにピキア由来自律複製に関与する遺伝子 (PARS1, PARS2) などを利用した宿主ベクター系が開発されており (*Mol. Cell. Biol.* 5, 3376 (1985))、高濃度培養とメタノールで誘導可能なAOXなど強いプロモーターが利用できる (*Nucleic Acids Res.* 15, 3859 (1987))。

20

30

【0058】

キャンディダ (*Candida*) 属においては、キャンディダ・マルトース (*Candida maltosa*)、キャンディダ・アルビカンス (*Candida albicans*)、キャンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、キャンディダ・ウチルス (*Candida utilis*) などにおいて宿主ベクター系が開発されている。キャンディダ・マルトースにおいてはキャンディダ・マルトース由来ARSがクローニングされ (*Agri. Biol. Chem.* 51, 51, 1587 (1987))、これを利用したベクターが開発されている。また、キャンディダ・ウチルスにおいては、染色体インテグレートタイプのベクターは強力なプロモーターが開発されている (特開平 08-173170)。

40

【0059】

アスペルギルス (*Aspergillus*) 属においては、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・オリジー (*Aspergillus oryzae*) などがカビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である (*Trends in Biotechnology* 7, 283-287 (1989))。

【0060】

トリコデルマ (*Trichoderma*) 属においては、トリコデルマ・リーゼイ (*Tr*

50

ichoderma reesei) を利用したホストベクター系が開発され、菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーターなどが利用できる (Biotechnology 7, 596-603 (1989))。

【0061】

また、微生物以外でも、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が開発されており、特に蚕を用いた昆虫 (Nature 315, 592-594 (1985)) や菜種、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中に大量に異種タンパク質を発現させる系が開発されており、好適に利用できる。

【0062】

本発明において使用するカルボニル還元酵素生産能を有する微生物は、カルボニル還元酵素生産能を有するトルラスポラ属に属するすべての菌株、突然変異株、変種、遺伝子操作技術の利用により作成された本発明の酵素生産能を獲得した形質転換株を含む。

【0063】

本発明は、前記カルボニル還元酵素を利用したケトンの還元による光学活性なアルコール、特に (S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造方法・用途に関する。本発明の好ましい態様においては、トルラスポラ属に属し、本発明のカルボニル還元酵素を産生する微生物を培養する工程を含む、本発明の酵素の製造方法を提供する。さらに本発明は、本発明の上記形質転換体を培養する工程を含む、本発明のカルボニル還元剤の製造方法を提供する。酵素分子、その処理物、酵素分子を含む培養物、あるいは酵素を生成する微生物等の形質転換体を反応溶液と接触させることにより、目的とする酵素反応を行わせることによって、光学活性なアルコールの製造を行うことができる。なお、酵素と反応溶液の接触形態はこれらの具体例に限定されるものではない。また、上記方法に使用される微生物としては、好ましくはトルラスポラ・デルブレッキー (*Torulaspora delbrueckii*) を挙げることができる。

【0064】

本発明の光学活性アルコールの製造方法の好ましい態様としては、本発明のカルボニル還元酵素、本発明のタンパク質、該酵素もしくはタンパク質を産生する微生物、該微生物の処理物、本発明の形質転換体、または本発明のカルボニル還元剤をケトンに作用させ、光学活性アルコールを製造することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法を提供する。また、本発明の方法の一例としては、本発明のカルボニル還元酵素、本発明のタンパク質、該酵素もしくはタンパク質を産生する微生物、該微生物の処理物、本発明の形質転換体、または本発明のカルボニル還元剤、を 3,4-ジメトキシフェニルアセトンに作用させ、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを製造することを特徴とする、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造方法を示すことができる。

【0065】

本発明におけるカルボニル還元酵素を含む微生物の処理物には、具体的には界面活性剤やトルエンなどの有機溶媒処理によって細胞膜の透過性を変化させた微生物、あるいはガラスビーズや酵素処理によって菌体を破碎した無細胞抽出液やそれを部分精製したものなどが含まれる。

【0066】

本発明による光学活性なアルコールの製造方法におけるケトンとしては、1-アセトキシ-2-プロパノン、アセト酢酸エチル、アセト酢酸メチル、4-クロロアセト酢酸エチル、4-クロロアセト酢酸メチル、2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノン、あるいは、3,4-ジメトキシフェニルアセトン、などが好適に用いられ、(S)-1-アセトキシ-2-プロパノール、(S)-3-ヒドロキシブタン酸エチル、(S)-3-ヒドロキシブタン酸メチル、(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸エチル、(R)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタン酸メチル、(R)-2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノール、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノール、などを製造することができる。

【0067】

本発明の好ましい態様においては、本発明のカルボニル還元酵素もしくはカルボニル還元活性を有するタンパク質、該酵素またはタンパク質を産生する微生物、もしくは該微生物の処理物、を3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに作用させ、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを製造することを特徴とする、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの製造方法を提供する。

【0068】

上記還元反応に付随してNADPHから生成するNADP⁺の、NADPHへの再生は、微生物の持つNADP⁺還元能（解糖系、メチロトロフのC1化合物資化経路など）を用いて行うことができる。これらNADP⁺還元能は、反応系にグルコースやエタノール、などを添加することにより増強することが可能である。また、NADP⁺からNADPHを生成する能力を有する微生物やその処理物、酵素を反応系に添加することによっても行うことができる。例えば、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、有機酸脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素など）などを含む微生物、その処理物、ならびに部分精製もしくは精製酵素を用いてNADPHの再生を行うことができる。これらのNADPH再生に必要な反応を構成する成分は、本発明による光学活性アルコールの製造のための反応系に添加する、固定化したものを添加する、あるいはNADPHの交換が可能な膜を介して接触させることができる。

【0069】

また本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターにより形質転換された形質転換体を培養する工程、を含む本発明のカルボニル還元活性を有するタンパク質の製造方法に関する。本方法において、本発明のポリヌクレオチドを含む組換えベクターで形質転換した微生物の生菌体を前記光学活性アルコールの製造方法に利用する場合には、NADPH再生のための付加的な反応系を不要とできる場合がある。すなわち、NADPH再生活性の高い微生物を用いることにより、形質転換体を用いた還元反応において、NADPH再生用の酵素を添加することなく効率的な反応が行える。さらに、NADPH再生に利用可能なグルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、ギ酸脱水素酵素、アミノ酸脱水素酵素、有機酸脱水素酵素（リンゴ酸脱水素酵素など）などの遺伝子（補酵素再生用脱水素酵素遺伝子）を、本発明のNADPH依存性カルボニル還元酵素をコードするDNAと同時に宿主に導入することによって、より効率的なNADPH再生酵素とNADPH依存性カルボニル還元酵素の発現、還元反応を行うことも可能である。これらの2つもしくはそれ以上の遺伝子の宿主への導入には、不和合性を避けるために複製起源の異なる複数のベクターに別々に遺伝子を導入した組換えベクターにより宿主を形質転換する方法や、単一のベクターに両遺伝子を導入する方法、両方、もしくは、片方の遺伝子を染色体中に導入する方法などを利用することができる。

【0070】

単一のベクター中に複数の遺伝子を導入する場合には、プロモーター、ターミネーターなど発現制御に関わる領域をそれぞれの遺伝子に連結する方法やラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させることも可能である。

【0071】

例えば、NADPH再生用酵素として、バシラス・サブチルス (*Bacillus subtilis*) やサーモプラズマ・アシドフィラム (*Thermoplasma acidophilum*) に由来するグルコース脱水素酵素が利用可能であり、具体的には、カルボニル還元酵素とバシラス・サブチルス由来のグルコース脱水素酵素の遺伝子を導入した組換えベクターであるpSG-TDR1、pSG-YDR1、pSG-YGP7、pSG-YGD9などが好適に利用される。

【0072】

本発明の酵素を用いた還元反応は、水中もしくは水に溶解しにくい有機溶媒、例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、n-ヘキサン、メチルイソブチルケトン、メチルターシャリーブチルエステルなどの有機溶媒中、もしくは、水性媒体との2相

系、もしくは水に溶解する有機溶媒、例えば、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール、アセトニトリル、アセトン、ジメチルスルホキシドなどとの混合系により行うことができる。本発明の反応は、固定化酵素、膜リアクターなどを利用して行うことも可能である。

【0073】

本発明の反応は、反応温度4-60℃、好ましくは15-37℃、pH3-11、好ましくはpH5-9、基質濃度0.01-50%、好ましくは0.1-20%、さらに好ましくは0.1-10%で行うことができる。反応系には必要に応じて補酵素NADP⁺もしくはNADPHが0.001mM-100mM、好ましくは、0.01-10mM添加できる。また、基質は反応開始時に一括して添加することも可能であるが、反応液中の基質濃度が高くなりすぎないように連続的、もしくは非連続的に添加することが望ましい。

10

【0074】

NADPHの再生のために、例えば、グルコース脱水素酵素を利用する場合のグルコース、アルコール脱水素酵素を利用する場合のエタノールもしくはイソプロパノールなどが反応系に添加される。これらの化合物は、基質ケトンに対してモル比で0.1-20、好ましくは1-5倍過剰に添加することができる。一方、グルコース脱水素酵素、アルコール脱水素酵素などの、NADPH再生用の酵素は、本発明のNADPH依存性カルボニル還元酵素に比較して酵素活性で0.1-100倍、好ましくは0.5-20倍程度添加することができる。

【0075】

本発明のケトンの還元により生成する光学活性アルコールの精製は、菌体、タンパク質の遠心分離、膜処理などによる分離、溶媒抽出、蒸留などを適当に組み合わせることにより行うことができる。

20

【0076】

例えば、(S)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールでは、微生物菌体を含む反応液を遠心分離し、微生物菌体を除いた後、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、ヘキサン、ベンゼン、メチルイソブチルケトン、メチルターシャリーブチルエーテル、ブタノール、などで抽出後、これを減圧濃縮することにより、光学活性アルコールとして、採取することができる。さらに反応生成物の純度を上げるには、シリカゲルカラムクロマトグラフィーなどを行うことにより、さらに高度に精製することができる。

30

【0077】

【実施例】

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0078】

【実施例1】 カルボニル還元酵素の精製

酵素精製のための菌体は、トルラスポラ・デルプレッキー JCM 5921株を1.2LのYM培地（グルコース20g/L、酵母エキス3g/L、麦芽エキス3g/L、ペプトン5g/L、pH 6.0）で培養した後、遠心分離により調製した。得られた湿菌体を50mM トリス-塩酸緩衝液（pH 8.5）、0.02% 2-メルカプトエタノールおよび2mM フェニルメタンスルホニルフルオリド（PMSF）で懸懸し、ビードビーター（Biospec社製）により破碎後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロタミン硫酸を添加し、遠心分離により除核酸した上清を得た。その上清に硫安が30%飽和になるまで添加し、30%硫安を含む標準緩衝液（10mMトリス-塩酸緩衝液（pH 8.5）、0.01% 2-メルカプトエタノール、10% グリセロール）で平衡化したフェニルセファロースHP（2.6cm×10cm）に添加した後、本酵素を硫安濃度30%-0%の勾配溶出により溶出した。NADPH依存性3,4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性は、勾配溶出面分に観察され、溶出したピーク部分を回収し、限外濾過により濃縮した。

40

【0079】

50

濃縮した酵素液を標準緩衝液に対して透析した後、同緩衝液で平衡化したMono Q (0.5 cm × 5 cm) に添加し、0-0.5 M塩化ナトリウムの勾配溶出を行った。溶出した活性画分を回収し、限外濾過により濃縮酵素液を得た。

【0080】

濃縮酵素液を0.01% 2-メルカプトエタノール、10%グリセロールを含む5 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に透析した後、同緩衝液で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム (0.5 cm × 10 cm) に添加し、5-350 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) の濃度勾配溶出を行った。溶出した活性画分の内、最も比活性が高かった画分をSDS-PAGEにより解析した結果、本酵素のみの単一バンドであった (図1)。

【0081】

精製酵素の比活性は196 mU/mgであった。精製の要約を表1に示す。

【0082】

【表1】

ステップ	タンパク質 (mg)	酵素活性 (U)	比活性 (mU/mg)
無細胞抽出液	15,000	-	-
除核酸	6,580	24.1	3.66
ブチルトヨパール	377	7.00	18.6
MonoQ	31.4	3.75	119
ハイドロキシアパタイト	0.245	0.048	196

【0083】

【実施例2】 カルボニル還元酵素の分子量測定

実施例1で得られた酵素のサブユニットの分子量をSDS-PAGEにより求めた結果、約38,000であった。また、スーパーデックスG200のゲルろ過カラムを用いて分子量を測定したところ、約38,000であった。従って、本酵素はモノマーと推定された。

【0084】

【実施例3】 カルボニル還元酵素の至適pH

リン酸カリウム緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、ブリットン・ロビンソンの広域緩衝液を用いてpHを変化させて、実施例1で得られた酵素の3,4-ジメトキシフェニルアセトンの還元活性を調べ、各pHにおける活性を、最大活性を100とした相対活性で表し、図2に示した。至適pH (80%以上の相対活性を示した範囲) は、5.5-6.5であった。

【0085】

【実施例4】 カルボニル還元酵素の至適温度

実施例1で得られた酵素を標準反応条件のうち温度だけを変化させて、3,4-ジメトキシフェニルアセトンの還元活性を測定し、各温度における活性を、最大活性を100とした相対活性で表し、図3に示した。至適温度 (80%以上の相対活性を示した温度範囲) は50-55℃であった。

【0086】

【実施例5】 カルボニル還元酵素の基質特異性

実施例1で得られた酵素を種々のケトン、ケトエステル、等と反応させ、その還元反応の活性を3,4-ジメトキシフェニルアセトンの還元を100とした相対活性で表し、表2 (カルボニル還元酵素の基質特異性) に示した。なお、1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールに対する脱水素活性は、次のように測定した。50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.5)、2.5 mM NADP⁺、5 mM 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールおよび酵素を含む反応液中30℃で反応させ、NA

10

20

30

40

50

D P Hの生成にともなう340 nmの吸光度の増大を測定する。1 Uは、1分間に1 μ molのNADPHの生成を触媒する酵素量とした。また、NADH依存的な3, 4-ジメトキシフェニルアセトンの還元活性は、次のようにして測定した。5.0 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、0.2 mM NADH、5 mM 3, 4-ジメトキシフェニルアセトンおよび酵素を含む反応液中30℃で反応させ、NADHの減少にともなう340 nmの吸光度の減少を測定する。1 Uは、1分間に1 μ molのNADHの減少を触媒する酵素量とした。

【0087】

【表2】

基質	濃度 (mM)	補酵素	相対活性 (%)
3, 4-ジメトキシフェニルアセトン	5	NADPH	100
3, 4-ジメトキシフェニルアセトン	5	NADH	0.0
(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノール	5	NADP+	0.0
(R)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノール	5	NADP+	0.0
アセト酢酸エチル	20	NADPH	3170
アセト酢酸メチル	20	NADPH	3670
4-クロロアセト酢酸エチル	20	NADPH	6780
4-クロロアセト酢酸メチル	20	NADPH	8040
2-クロロ-1-(3'-クロロフェニル)エタノン	2	NADPH	922
2, 3-ブタンジオン	20	NADPH	1480
2, 4-ペンタンジオン	20	NADPH	422
アセトフェノン	20	NADPH	256
1-アセトキシ-2-プロパノン	20	NADPH	24700
2-アセトキシシクロペンタノン	20	NADPH	567
4'-メトキシプロピオフェノン	20	NADPH	283
ベンジルアセトン	20	NADPH	739
フェノキシ-2-プロパノン	20	NADPH	939
2-アセトキシ-3-ブタノン	20	NADPH	589
ピルビン酸メチル	20	NADPH	1320
カンファークイノン	1	NADPH	644
2, 3-ペンタンジオン	20	NADPH	2590
メトキシアセトン	20	NADPH	117

【0088】

【実施例6】 カルボニル還元酵素を用いた (S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの合成

200 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、1 mM NADP⁺、2 U グルコース脱水素酵素 (WAKO純薬)、250 mM グルコース、0.25 U カルボニル還元酵素、50 mM 3, 4-ジメトキシフェニルアセトンを含む反応液1 mL中で、25℃で終夜反応させた。生成した (S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの光学純度は次のようにして求めた。反応液0.5 mLに酢酸エチル1 mLを加えて、(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールを抽出し、抽出溶媒を脱溶媒した後、0.5 mLの溶解液 (n-ヘキサン: イソプロパノール=4:1) を加えて溶解し、光学分割カラムを用いた液体クロマトグラフィーにより分析した。光学分割カラムは、ダイセル化学工業株式会社製キラルセルOF (CHIRALCEL OF 4.6 mm × 25 cm) を使い、n-ヘキサン: イソプロパノール=4:1の溶離液、流速1.0 mL/min、波長220 nm、温度40℃により行った。その結果、本発明によって生成した (S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールは99% ee以上であった。

【0089】

また、生成された (S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールをガスクロマトグラフィーで定量し、出発原料である3, 4-ジメトキシフェニルアセトンに対する収率を求めた。すなわち、Thermon 3000 (10%) - Chromoso

r b W (AW-DMCS, Mesh 60-80)、3.2mm x 210cmを用い、カラム温度を210℃とし、水素炎イオン化検出器 (FID) を利用して分析した。その結果、反応の収率は約95%であった。

【0090】

【実施例7】 カルボニル還元酵素の部分アミノ酸配列

実施例1で得られた酵素を用いて、プロテインシーケンサーによりN末端アミノ酸配列を解析した。アミノ酸配列を配列番号: 3に示した。また、SDS-PAGEのゲルより、カルボニル還元酵素を含むゲル断片を切り出し、2回洗浄後、リジルエンドペプチダーゼを用いて、35℃で終夜イン・ゲル・ダイジェションを行った。消化したペプチドを逆相HPLC (東ソー製TSK gel ODS-80-Ts、2.0mm x 250mm) を用い、0.1% トリフルオロ酢酸中でアセトニトリルのグラジエント溶出によりペプチドを分離し、分取した。

【0091】

分取したペプチドピークを lep_41とし、プロテインシーケンサー (Hewlett Packard G1005A Protein Sequencer System) によりアミノ酸配列の解析を行った。lep_41のアミノ酸配列を配列番号: 4で示した。

【0092】

【実施例8】 トルラスボラ・デルブレッキーからの染色体DNAの精製

トルラスボラ・デルブレッキー JCM 5921株をYM培地で培養し、菌体を調製した。菌体からの染色体DNAの精製は、Meth. Cell Biol. 29, 39-44 (1975) に記載の方法により行った。

【0093】

【実施例9】 カルボニル還元酵素遺伝子のコア領域のクローニング

N末端、lep_41のアミノ酸配列を元にそれぞれセンスプライマー、アンチセンスプライマーを合成した。それぞれの塩基配列を配列番号: 5 (TdCR-N1)、6 (TdCR-41) に示した。

【0094】

プライマーTdCR-N1とTdCR-41各50pmol、dNTP10nmol、トルラスボラ・デルブレッキー由来染色体DNA50ng、Ex-Taq用緩衝液 (宝酒造製)、Ex-Taq 2U (宝酒造製) を含む50μLの反応液を用い、変性 (94℃、30秒)、アニール (51℃、30秒)、伸長 (70℃、20秒) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) を用いて行った。

【0095】

PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、330bpあたりに特異的と思われるバンドが検出できた。得られたDNA断片をフェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿として回収し、EcoRIで制限酵素消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分の断片を切り出し、Sephaglas Band Prep Kit (ファルマシア製) により精製した。

【0096】

得られたDNA断片を、EcoRIで消化したpUC18 (宝酒造製) とTakara Ligation Kitを用いて、ライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。

【0097】

形質転換株をアンピシリン (50μg/mL) を含むLB培地 (1%バクトートリプトン、0.5%バクトー酵母エキス、1%塩化ナトリウム、以下、LB培地と略す) プレート上で生育させ、Blue/Whiteセレクトション法により選別されたいくつかの白色のコロニーをアンピシリンを含む液体LB培地で培養し、Flexi-Prep (ファルマシア製) によりプラスミドを精製し、pTDRとした。

【0098】

精製したプラスミドを用いて、挿入DNAの塩基配列を解析した。DNA塩基配列の解析には、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS ready Reaction Kit (パーキンエルマー製)を用いてPCRを行い、DNAシーケンサーABI PRISMTM 310 (パーキンエルマー製)により行った。決定されたコア領域の塩基配列を配列番号：7として示した。

【0099】

【実施例10】 カルボニル還元酵素遺伝子のコア領域周辺の塩基配列の解析
トルラスボラ・デルプレッキー由来染色体DNAを制限酵素BamHIで消化し、T4リガーゼを用いて16℃で終夜セルフ・ライゲーション反応により、各断片を環化させた。次に、プライマーTdCR-59 (配列番号：8) およびTdCR-234 (配列番号：9) を各100 pmol、環化DNAを25 ng、Ex-Taq用緩衝液 (宝酒造製)、Ex-Taq 2 U (宝酒造製) を含む50 μLの反応液を用い、変性 (94℃、30秒)、アニール (55℃、30秒)、伸長 (72℃、7分) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) を用いて行った。PCR反応液の一部をアガロースゲル電気泳動により解析した結果、約2000 bpのDNA断片が検出できた。このDNA断片をSephaglas BandPrep Kit (ファルマシア製) により精製し、塩基配列をプライマーウォーキング法により解析した。その結果、カルボニル還元酵素遺伝子のORF配列を決定することができた。決定したDNA配列は配列番号：1に、予想されるアミノ酸配列を配列番号：2に示す。ORF検索は、Genetyx-win (株式会社ゼネティックス製) ソフトを用いて行った。

【0100】

【実施例11】 カルボニル還元酵素遺伝子TdCR1の一部を含むプラスミドpSE-TDXの構築

カルボニル還元酵素遺伝子のORFの5'末端からXbaI部位までをクローニングするために、プライマーTd-ATG1 (配列番号：10)、Td-XbaR (配列番号：11) を合成した。

【0101】

プライマーTd-ATG1とTd-XbaRを各50 pmol、dNTP10 nmol、トルラスボラ・デルプレッキー由来染色体DNA50 ng、Pfu Turbo DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu Turbo DNA polymerase 3.75 U (STRATAGENE製) を含む50 μLの反応液を用い、変性 (95℃、2分30秒)、アニール (55℃、1分)、伸長 (72℃、1分) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) を用いて行った。得られたPCR産物をTd-PCR1とした。

【0102】

得られたPCR産物を、フェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿として回収した。Td-PCR1をBspHI、XbaIの2つの制限酵素で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分を取り出し、Sephaglas BandPrep Kit (ファルマシア製) により精製した。

【0103】

制限酵素消化されたTd-PCR1は、NcoI、XbaIの2つの制限酵素で消化したベクターpSE420D (特開2000-189170) とTakara Ligation Kitを用いてライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換株をアンピシリンを含むLB培地で生育させ、挿入断片の塩基配列を解析した。ここで得られたプラスミドをpSE-TDXとした。プラスミド構築の過程を図4に示した。

【0104】

【実施例12】 カルボニル還元酵素遺伝子TdCR1の一部を含むプラスミドpUC-TDXの構築

カルボニル還元酵素遺伝子のORFのXbaI部位から3'末端までをクローニングするために、プライマーTd-XbaF（配列番号：12）、Td-TAA1（配列番号：13）を合成した。

【0105】

プライマーTd-XbaFとTd-TAA1を各50 pmol、dNTP10 nmol、トルラスポラ・デルブレッキー由来染色体DNA 50ng、Pfu Turbo DNA polymerase用緩衝液（STRATAGENE製）、Pfu Turbo DNA polymerase 3.75 U（STRATAGENE製）を含む50μLの反応液を用い、変性（95℃、2分30秒）、アニール（55℃、1分）、伸長（72℃、1分）を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400（パーキンエルマー製）を用いて行った。得られたPCR産物をTd-PCR2とした。

【0106】

得られたPCR産物を、フェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿として回収した。Td-PCR2をXbaIで消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分を取り出し、Sephaglas BandPrep Kit（ファルマシア製）により精製した。

【0107】

制限酵素消化されたTd-PCR2は、XbaIで消化したpUC18（宝酒造製）とTakara Ligation Kitを用いてライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換株をアンピシリンを含むLB培地で生育させ、挿入断片の塩基配列を解析した。ここで得られたプラスミドをpUC-TDXとした。プラスミド構築の過程を図5に示した。

【0108】

【実施例13】 カルボニル還元酵素遺伝子TdCR1の一部を含むプラスミドpSG-TDXの構築

実施例11に記載の方法と同様の方法で得られたPCR産物Td-PCR1を、フェノールクロロホルム抽出後、エタノール沈殿後、BspHI、XbaIの2つの制限酵素で消化した後、アガロースゲル電気泳動を行い、目的とするバンドの部分を取り出し、Sephaglas BandPrep Kit（ファルマシア製）により精製した。

【0109】

制限酵素消化されたTd-PCR1は、NcoI、XbaIの2つの制限酵素で消化した枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1（特開2000-189170）とTakara Ligation Kitを用いてライゲーションし、大腸菌JM109株を形質転換した。形質転換株をアンピシリンを含むLB培地で生育させ、挿入断片の塩基配列を解析した。ここで得られたプラスミドをpSG-TDXとした。プラスミド構築の過程を図6に示した。

【0110】

【実施例14】 カルボニル還元酵素遺伝子TdCR1を発現するプラスミドpSE-TDR1の構築

実施例12で得られたプラスミドpUC-TDXを制限酵素XbaIで消化し、エタノール沈殿後、アガロース電気泳動を行い、TdCR1遺伝子の一部を含む約0.8 kbのバンドを取り出し、Sephaglas BandPrep（Amersham Pharmacia Biotech製）により精製、回収した。得られたDNA断片と、同制限酵素で消化し、アルカリフォスファターゼ処理後、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿したプラスミドpSE-TDXをTakara Ligation Kitを用いてライゲーションした。ライゲーションしたDNAによって大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン（50 mg/L）を含むLB培地で生育させ、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製した。その結果、全TdCR1遺伝子を含み、TdCR1を発現可能なプラスミド

である pSE-TDR1 を得た。プラスミド構築の過程を図 7 に示した。

【0111】

【実施例 15】 カルボニル還元酵素遺伝子 TdCR1 と枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミド pSG-TDR1 の構築

実施例 12 で得られたプラスミド pUC-TDX を制限酵素 XbaI で消化し、エタノール沈殿後、アガロース電気泳動を行い、TdCR1 遺伝子の一部を含む約 0.8 bp のバンドを切り出し、Sephaglas Band Prep (Amersham Pharmacia Biotech 製) により精製、回収した。得られた DNA 断片と、同制限酵素で消化し、アルカリフォスファターゼ処理後、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿したプラスミド pSG-TDX を、TaKaRa Ligation Kit を用いてライゲーションした。ライゲーションした DNA によって大腸菌 JM109 株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含む LB 培地で生育させ、得られた形質転換株よりプラスミドを Flexi Prep により精製した。その結果、グルコース脱水素酵素と TdCR1 を同時に発現可能なプラスミドである pSG-TDR1 を得た。

【0112】

プラスミド構築の過程を図 8 に示した。

【0113】

【実施例 16】 カルボニル還元酵素の活性確認

カルボニル還元酵素を発現するプラスミド pSE-TDR1 とカルボニル還元酵素と枯草菌由来のグルコース脱水素酵素を共発現するプラスミド pSG-TDR1 で形質転換された大腸菌 JM109 株をアンピシリンを含む液体 LB 培地で終夜 30℃ 培養し、0.1 mM IPTG を加え、さらに 4 時間培養を行った。

【0114】

菌体を遠心分離により集菌した後、0.5 M NaCl、0.02% 2-メルカプトエタノール、2 mM PMSF、10% グリセリンを含む 50 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) に懸濁し、超音波により菌体を破碎後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とした。無細胞抽出液を用いて 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性とグルコース脱水素活性を測定した。なお、グルコース脱水素活性は、次のように測定した。100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、2.5 mM NAD⁺、100 mM グルコースおよび酵素を含む反応液中で 30℃ で行った。1 U は、上記反応条件において 1 分間に 1 μmol の NADH 生成を触媒する酵素量とした。

【0115】

各無細胞抽出液を用いて 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性とグルコース脱水素酵素活性を測定した結果を表 3 に示した。いずれも 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性を有することが確認された。

【0116】

【表 3】

プラスミド	3,4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性 mU/mg-protein	グルコース脱水素酵素 U/mg-protein
なし	0	0
pSE-TDR1	61.6	0
pSG-TDR1	57.0	4.07

【0117】

【実施例 17】 サッカロマイセス・セレビジエからの染色体 DNA の精製

サッカロマイセス・セレビジエ X2180-1B (Yeast Genetic Stock Center) を YM 培地で培養し、菌体を調製した。菌体からの染色体 DNA の精製は、Meth. Cell Biol. 29, 39-44 (1975) に記載の方法により行った。

【0118】

【実施例 18】 カルボニル還元酵素のホモログ YGL157w のクローニング

DDBJに登録されている予想タンパク質YGL157w (SWISS-PROT Accession No. P53111) に対応するDNA配列 (DDBJ Accession No. Z48618) を基にPCR用プライマーYGL1-ATG1 (配列番号: 14)、YGL1-TAA1 (配列番号: 15) を合成した。

【0119】

プライマーを各25 pmol、dNTP10 nmol、サッカロマイセス・セレビジエ由来染色体DNA50 ng、Pfu DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu DNA polymerase 2U (STRATAGENE製) を含む50 μLの反応液を用い、変性 (95℃、45秒)、アニール (55℃、30秒)、伸長 (72℃、1分20秒) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) を用いてPCRを行った結果、特異的な増幅産物が得られた。

【0120】

増幅産物をフェノール処理後、制限酵素BspHI, XbaIで2重消化し、制限酵素NcoI, XbaIで2重消化したベクターpSE420DとTAKARA Ligation Kitによりライゲーションした。ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製した。

【0121】

プラスミドの挿入DNA部分の塩基配列を解析し、その結果を配列番号: 19に示した。得られた塩基配列は、DDBJに登録されている塩基配列と完全に一致した。得られたプラスミドをpSE-YGP7とした。配列番号: 16の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 17に示した。プラスミド構築の過程を図9に示した。

【0122】

【実施例19】 カルボニル還元酵素のホモログYGL157wと枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミドpSG-YGP7の構築
枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1 (特願2000-374593) をNheI、XbaIの2つの制限酵素で二重消化し、pSE-YGP7から同酵素で切り出したYGL157w遺伝子を含むDNA断片とTakara Ligation Kitを用いてライゲーションした。ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製し、グルコース脱水素酵素とYGL157wを同時に発現可能なプラスミドであるpSG-YGP7を得た。プラスミド構築の過程を図10に示した。

【0123】

【実施例20】 カルボニル還元酵素のホモログ YGL039w のクローニング
DDBJに登録されている予想タンパク質YGL039w (SWISS-PROT Accession No. P53183) に対応するDNA配列 (DDBJ Accession No. Z72561) を基にPCR用プライマーYGL2-ATG2 (配列番号: 18)、YGL2-TAA2 (配列番号: 19) を合成した。

【0124】

プライマーを各25 pmol、dNTP10 nmol、サッカロマイセス・セレビジエ由来染色体DNA50 ng、Pfu DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu DNA polymerase 2U (STRATAGENE製) を含む50 μLの反応液を用い、変性 (95℃、45秒)、アニール (50℃、30秒)、伸長 (72℃、1分15秒) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) を用いてPCRを行った結果、特異的な増幅産物が得られた。

【0125】

増幅産物をフェノール処理後、制限酵素BspHI, NheIで2重消化し、制限酵素

Nco I, Xba I で2重消化したベクターpSE420DとTAKARA Ligation Kit によりライゲーションした。ライゲーションしたDNAにより大腸菌 JM109 株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製した。プラスミドの挿入DNA部分の塩基配列を解析し、その結果を配列番号: 20に示した。得られた塩基配列は、DDBJに登録されている塩基配列と完全に一致した。得られたプラスミドをpSE-YGD9とした。配列番号: 20の塩基配列から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 21に示した。プラスミド構築の過程を図11に示した。

【0126】

【実施例21】 カルボニル還元酵素のホモログYGL039wと枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミドpSG-YGD9の構築 10

pSE-YGD9をEcoRI、HindIIIの2つの制限酵素で二重消化し、枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1 (特願2000-374593) から同酵素で切り出したグルコース脱水素遺伝子を含むDNA断片とTakara Ligation Kitを用いてライゲーションした。

【0127】

ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製し、グルコース脱水素酵素とYGL039wを同時に発現可能なプラスミドであるpSG-YGD9を得た。プラスミド構築の過程を図12に示した。 20

【0128】

【実施例22】 カルボニル還元酵素のホモログ YDR541c のクローニング
DDBJに登録されている予想タンパク質YDR541c (SWISS-PROT Accession No. U43834-5) に対応するDNA配列 (DDBJ Accession No. Z48239) を基にPCR用プライマーYDR-ATG1 (配列番号: 18)、YDR-TAA1 (配列番号: 23) を合成した。

【0129】

プライマーを各25 pmol、dNTP 10 nmol、サッカロマイセス・セレビジエ由来染色体DNA 50 ng、Pfu DNA polymerase用緩衝液 (STRATAGENE製)、Pfu DNA polymerase 2U (STRATAGENE製) を含む50 μLの反応液を用い、変性 (95℃、45秒)、アニール (52℃、30秒)、伸長 (72℃、1分20秒) を30サイクル、GeneAmp PCR System 2400 (パーキンエルマー製) を用いてPCRを行った結果、特異的な増幅産物が得られた。 30

【0130】

増幅産物をフェノール処理後、制限酵素AflIII, XbaIで2重消化し、制限酵素NcoI, XbaIで2重消化したベクターpSE420DとTAKARA Ligation Kit によりライゲーションした。ライゲーションしたDNAにより大腸菌 JM109 株を形質転換し、アンピシリン (50 mg/L) を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製した。プラスミドの挿入DNA部分の塩基配列を解析し、その結果を配列番号: 27に示した。得られた塩基配列は、DDBJに登録されている塩基配列と完全に一致した。得られたプラスミドをpSE-YDR1とした。配列番号: 24から予想されるアミノ酸配列を配列番号: 25に示した。プラスミド構築の過程を図13に示した。 40

【0131】

【実施例23】 カルボニル還元酵素のホモログYDR541cと枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を共発現するプラスミドpSG-YGP7の構築
pSE-YDR1をEcoRI、HindIIIの2つの制限酵素で二重消化し、枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を含むプラスミドpSE-BSG1 (特願2000-374593) から同酵素で切り出したグルコース脱水素遺伝子を含むDNA断片とTa 50

kara Ligation Kitを用いてライゲーションした。

【0132】

ライゲーションしたDNAにより大腸菌JM109株を形質転換し、アンピシリン（5.0 mg/L）を含むLB培地で生育し、得られた形質転換株よりプラスミドをFlexiPrepにより精製し、グルコース脱水素酵素とYDR541cを同時に発現可能なプラスミドであるpSG-YDR1を得た。プラスミド構築の過程を図14に示した。

【0133】

【実施例24】 カルボニル還元酵素のホモログ YGL157w、YGL039w、YDR541c の活性確認

pSE-YGP7, pSE-YGD9, pSE-YDR1, pSG-YGP7, pSG-YGD9, pSG-YDR1をそれぞれ含有する大腸菌JM109株をアンピシリンを含むLB培地で培養し、0.1 mM IPTGにより誘導を4時間行い、遠心分離により集菌菌体を得た。

【0134】

それぞれの菌体を菌体破碎液（50 mM KPB pH 8.0、1 mM EDTA、0.02% 2-ME、2 mM PMSF、10% Glycerol）に懸濁し、超音波により菌体を破碎後、遠心分離により得られた上清を無細胞抽出液とした。

【0135】

各無細胞抽出液を用いて3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性を測定した結果を表4に示した。YGL157w（pSE-YGP7とpSG-YGP7）、YGL039w（pSE-YGD9とpSG-YGD9）、YDR541c（pSE-YDR1とpSG-YDR1）は、いずれも3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元酵素活性を有することが確認された。

【0136】

【表4】

プラスミド	3,4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性	グルコース脱水素活性
	mU/mg-protein	mU/mg-protein
なし	0.0	0.0
pSE-YGP7	39.0	0.0
pSG-YGP7	6.85	2320
pSE-YGD9	19.1	0.0
pSG-YGD9	20.0	1340
pSE-YDR1	21.0	0.0
pSG-YDR1	30.0	30.0

【0137】

【実施例25】 カルボニル還元酵素のホモログ YGL157w, YGL039w, YDR541c による（S）-1-（3, 4-ジメトキシフェニル）-2-プロパノールの合成実施例18で調製した粗酵素液をUF膜にて10倍に濃縮して酵素反応用の粗酵素液を調製した後、200 mM リン酸カリウム緩衝液（pH 6.5）、1 mM NADP⁺、2 U グルコース脱水素酵素（WAKO純薬）、250 mM グルコース、0.2 U ホモログ酵素、50 mM 3, 4-ジメトキシフェニルアセトンを含む反応液1 mL中で、25℃で終夜反応させた。生成した（S）-1-（3, 4-ジメトキシフェニル）-2-プロパノールの光学純度、および定量は実施例6と同様に行った。その結果、YGL157w（pSE-YGP7）は収率66%で93.7% ee、YGL039w（pSE-YGD9）は収率94%で93.6% ee、YDR541c（pSE-YDR1）は収率6%で94.8% eeの（S）-1-（3, 4-ジメトキシフェニル）-2-プロパノールを生成した。

【0138】

【発明の効果】

光学活性アルコールなどの生産に有用な、NADPH依存性のカルボニル還元酵素が提供

された。本酵素を利用することにより、3, 4-ジメトキシフェニルアセトンから光学純度の高い(S)-1-(3, 4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノールの効率的な生産方法が提供された。

【0139】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

(110) DAICEL CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.

10

(120) Polynucleotides encoding a novel carbonyl reductase, its homologues, and use thereof

(130) D1-A0302Y1

(150) JP 2003-113402

20

(151) 2003-04-17

(160) 25

(170) PatentIn version 3.1

(210) 1

30

(211) 1035

(212) DNA

(213) *Torulaspora delbrueckii*

(220)

(221) CDS

(222) (1)..(1032)

40

(223)

(400) 1

atg tct att cta gtt tct ggt gct act ggt ttt att gct cta cat gtt 48
Met Ser Ile Leu Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe Ile Ala Leu His Val

1

5

10

15

gtc agt gat ttg ttg aag cag gat tac aaa gtt att ggt act gtt aga 96
 Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Asp Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg
 20 25 30

tct caa gaa aaa gct gat aaa ttg cgt aag caa ttt ggc aac aat ccc 144 10
 Ser Gln Glu Lys Ala Asp Lys Leu Arg Lys Gln Phe Gly Asn Asn Pro
 35 40 45

aat ctt tcc ttt gaa ttg gtt tca gat att gct gct cct gaa gct ttt 192
 Asn Leu Ser Phe Glu Leu Val Ser Asp Ile Ala Ala Pro Glu Ala Phe
 50 55 60

gac aaa gtc ttt cag aaa cat ggc aag gac atc aaa gtg gtg ttg cac 240
 Asp Lys Val Phe Gln Lys His Gly Lys Asp Ile Lys Val Val Leu His
 65 70 75 80

aca gct tct cct ttc act cta gaa acc aca aat tat gag aaa gat ctg 288
 Thr Ala Ser Pro Phe Thr Leu Glu Thr Thr Asn Tyr Glu Lys Asp Leu
 85 90 95 30

ttg ctt cca gca gtg aat ggt aca aag agt atc ctg gag tcg att aag 336
 Leu Leu Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Ser Ile Leu Glu Ser Ile Lys
 100 105 110

aaa tac gct gct gat tct gtc gag aga gta gtc atc aca tcg tct tac 384
 Lys Tyr Ala Ala Asp Ser Val Glu Arg Val Val Ile Thr Ser Ser Tyr
 115 120 125 40

gct gcc gtc atg aat gtt tcg aaa gaa ggc gac ggc tca ata gtc tac	432	
Ala Ala Val Met Asn Val Ser Lys Glu Gly Asp Gly Ser Ile Val Tyr		
130 135 140		
act gag aag gat tgg aac cct gcc act tgg gaa aac tgt cag ata gat	480	
Thr Glu Lys Asp Trp Asn Pro Ala Thr Trp Glu Asn Cys Gln Ile Asp		10
145 150 155 160		
ggt ttg aat gct tat tgt ggg tcc aag aag cta gca gaa aag gct gca	528	
Gly Leu Asn Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Leu Ala Glu Lys Ala Ala		
165 170 175		
tgg gac ttc ttt gaa gat aat aaa aac gtt gtc aag ttc aaa ctg agc	576	20
Trp Asp Phe Phe Glu Asp Asn Lys Asn Val Val Lys Phe Lys Leu Ser		
180 185 190		
atg atc aat cct act tac gtt ttc ggg cct cag cta ttt gat gag gac	624	
Met Ile Asn Pro Thr Tyr Val Phe Gly Pro Gln Leu Phe Asp Glu Asp		
195 200 205		30
gtg aag gat aaa ttg aat act tcc tgt gag cta att aac tca att ata	672	
Val Lys Asp Lys Leu Asn Thr Ser Cys Glu Leu Ile Asn Ser Ile Ile		
210 215 220		
aag aat aat cct cag gtg gga tat cta tta gag aat att aaa ggt cat	720	
Lys Asn Asn Pro Gln Val Gly Tyr Leu Leu Glu Asn Ile Lys Gly His		
225 230 235 240		40

ttc gtt gat gtc aga gat gtt gct aag gct cac ttg gtg gca ttc caa	768	
Phe Val Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Ala His Leu Val Ala Phe Gln		
245 250 255		
aag gat gaa gct att gga cag aga ctg ctc acc tca aat ggt cgt ttc	816	
Lys Asp Glu Ala Ile Gly Gln Arg Leu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Phe		
260 265 270		10
gct tac caa gac ctc gta gat att atc aat gag gat ttc cca caa ttg	864	
Ala Tyr Gln Asp Leu Val Asp Ile Ile Asn Glu Asp Phe Pro Gln Leu		
275 280 285		
aag ggt aag gtc att gta gga aag cca ggt gcc ggt aaa caa ttg tat	912	
Lys Gly Lys Val Ile Val Gly Lys Pro Gly Ala Gly Lys Gln Leu Tyr		20
290 295 300		
ggc act ttc cca gac atc aac aac acc aga tcg aag gag att ttg ggc	960	
Gly Thr Phe Pro Asp Ile Asn Asn Thr Arg Ser Lys Glu Ile Leu Gly		
305 310 315 320		
ttc gaa ttc atc tct ctg cat aaa tcc gtc cat gac act gct gct caa	1008	30
Phe Glu Phe Ile Ser Leu His Lys Ser Val His Asp Thr Ala Ala Gln		
325 330 335		
gtt ttg aaa aaa gaa ggc aaa ttg taa	1035	
Val Leu Lys Lys Glu Gly Lys Leu		
340		40

(210) 2
 (211) 344
 (212) PRT
 (213) *Torulaspora delbrueckii*

(400) 2

Met Ser Ile Leu Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe Ile Ala Leu His Val 10
 1 5 10 15

Val Ser Asp Leu Leu Lys Gln Asp Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg
 20 25 30

Ser Gln Glu Lys Ala Asp Lys Leu Arg Lys Gln Phe Gly Asn Asn Pro 20
 35 40 45

Asn Leu Ser Phe Glu Leu Val Ser Asp Ile Ala Ala Pro Glu Ala Phe
 50 55 60

Asp Lys Val Phe Gln Lys His Gly Lys Asp Ile Lys Val Val Leu His 30
 65 70 75 80

Thr Ala Ser Pro Phe Thr Leu Glu Thr Thr Asn Tyr Glu Lys Asp Leu
 85 90 95

Leu Leu Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Ser Ile Leu Glu Ser Ile Lys
 100 105 110

Lys Tyr Ala Ala Asp Ser Val Glu Arg Val Val Ile Thr Ser Ser Tyr 40
 115 120 125

Ala Ala Val Met Asn Val Ser Lys Glu Gly Asp Gly Ser Ile Val Tyr
130 135 140

Thr Glu Lys Asp Trp Asn Pro Ala Thr Trp Glu Asn Cys Gln Ile Asp
145 150 155 160

Gly Leu Asn Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Leu Ala Glu Lys Ala Ala
165 170 175

Trp Asp Phe Phe Glu Asp Asn Lys Asn Val Val Lys Phe Lys Leu Ser
180 185 190

Met Ile Asn Pro Thr Tyr Val Phe Gly Pro Gln Leu Phe Asp Glu Asp
195 200 205

Val Lys Asp Lys Leu Asn Thr Ser Cys Glu Leu Ile Asn Ser Ile Ile
210 215 220

Lys Asn Asn Pro Gln Val Gly Tyr Leu Leu Glu Asn Ile Lys Gly His
225 230 235 240

Phe Val Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Ala His Leu Val Ala Phe Gln
245 250 255

Lys Asp Glu Ala Ile Gly Gln Arg Leu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Phe
260 265 270

Ala Tyr Gln Asp Leu Val Asp Ile Ile Asn Glu Asp Phe Pro Gln Leu

10

20

30

40

275

280

285

Lys Gly Lys Val Ile Val Gly Lys Pro Gly Ala Gly Lys Gln Leu Tyr

290

295

300

Gly Thr Phe Pro Asp Ile Asn Asn Thr Arg Ser Lys Glu Ile Leu Gly

305

310

315

320

10

Phe Glu Phe Ile Ser Leu His Lys Ser Val His Asp Thr Ala Ala Gln

325

330

335

Val Leu Lys Lys Glu Gly Lys Leu

340

20

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> *Torulaspora delbrueckii*

<400> 3

30

Ser Ile Leu Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe

1

5

10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

40

<213> *Torulaspora delbrueckii*

<400> 4

Asp Leu Leu Leu Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys

1

5

10

10

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

20

<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> "n" = a, t, c, or g.

30

<400> 5

gtcgaattca tytttgtbtc hggwgchacn gg

32

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

40

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

10

<223> "n" = a, t, c, or g.

<400> 6

gtcgaattct tdgtwccrit vacdgcngg

29

<210> 7

20

<211> 306

<212> DNA

<213> *Torulaspora delbrueckii*

<400> 7

attttagigt ccggigcaac aggttttatt gctctacatg ttgtcagiga tttgttgaag 60

30

caggattaca aagttatigg tactgtttaga tctcaagaaa aagctgataa attgcgtaag 120

caattiggca acaatcccaa tcttcccttt gaatiggttt cagatatigc tgctcctgaa 180

gctttigaca aagcttttca gaaacaiggc aaggacatca aagtggigtg gcacacagct 240

tctcccttca ctctagaaac cacaaattat gagaaagatc tgttgcttcc tgccgtcaac 300

40

ggtact

306

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

10

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 8

ctaacagtac caataacttt gtaatccigc

30

20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

30

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 9

cacagcttct cctttcactc

20

<210> 10

40

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 10

gtcggatcct atcatgagta ttcttgtttc tgggtgtact gg

42

10

<210> 11

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial

20

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 11

gtggtttcta gaggtaaagg agaagc

26

30

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

40

<400> 12

ctttcacict agaaaccaca aattatgaga aagatc

36

<210> 13

<211> 53

10

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 13

20

gacctgcagt atctagatta caattgcct tctttttica aaactigagc agc

53

<210> 14

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial

30

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 14

gagtcatgac tactgatacc actgttttcg

30

40

(210) 15
 (211) 40
 (212) DNA
 (213) Artificial

(220)

(223) an artificially synthesized primer sequence

10

(400) 15

gagtcctagat tatgcttcac ttggaacttc taacatttgc

40

(210) 16

(211) 1044

20

(212) DNA

(213) *Saccharomyces cerevisiae*

(220)

(221) CDS

(222) (1)..(1041)

(223)

30

(400) 16

atg act act gat acc act gtt ttc gtt tct ggc gca acc ggt ttc att

48

Met Thr Thr Asp Thr Thr Val Phe Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe Ile

1

5

10

15

gct cta cac att atg aac gat ctg ttg aaa gct ggc tat aca gtc atc

96

40

Ala Leu His Ile Met Asn Asp Leu Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Val Ile

20	25	30		
ggc tca ggt aga tct caa gaa aaa aat gat ggc ttg ctg aaa aaa ttt			144	
Gly Ser Gly Arg Ser Gln Glu Lys Asn Asp Gly Leu Leu Lys Lys Phe				
35	40	45		
aat aac aat ccc aaa cta tcg atg gaa att gtg gaa gat att gct gct			192	10
Asn Asn Asn Pro Lys Leu Ser Met Glu Ile Val Glu Asp Ile Ala Ala				
50	55	60		
cca aac gcc ttt gat gaa gtt ttc aaa aaa cat ggt aag gaa att aag			240	
Pro Asn Ala Phe Asp Glu Val Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys				
65	70	75	80	
att gtg cta cac act gcc tcc cca ttc cat ttt gaa act acc aat ttt			288	20
Ile Val Leu His Thr Ala Ser Pro Phe His Phe Glu Thr Thr Asn Phe				
85	90	95		
gaa aag gat tta cta acc cct gca gtg aac ggt aca aaa tct atc ttg			336	
Glu Lys Asp Leu Leu Thr Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Ser Ile Leu				
100	105	110		30
gaa gcg att aaa aaa tat gct gca gac act gtt gaa aaa gtt att gtt			384	
Glu Ala Ile Lys Lys Tyr Ala Ala Asp Thr Val Glu Lys Val Ile Val				
115	120	125		
act tcg tct act gct gct ctg gtg aca cct aca gac atg aac aaa gga			432	
Thr Ser Ser Thr Ala Ala Leu Val Thr Pro Thr Asp Met Asn Lys Gly				40
130	135	140		

gat ttg gtg atc acg gag gag agt tgg aat aag gat aca tgg gac agt	480	
Asp Leu Val Ile Thr Glu Glu Ser Trp Asn Lys Asp Thr Trp Asp Ser		
145 150 155 160		
tgt caa gcc aac gcc gtt gcc gca tat tgt ggc tgc aaa aag ttt gct	528	
Cys Gln Ala Asn Ala Val Ala Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Phe Ala		10
165 170 175		
gaa aaa act gct tgg gaa ttt ctt aaa gaa aac aag tct agt gtc aaa	576	
Glu Lys Thr Ala Trp Glu Phe Leu Lys Glu Asn Lys Ser Ser Val Lys		
180 185 190		
ttc aca cta tcc act atc aat ccg gga ttc gtt ttt ggt cct caa atg	624	20
Phe Thr Leu Ser Thr Ile Asn Pro Gly Phe Val Phe Gly Pro Gln Met		
195 200 205		
ttt gca gat tgc cta aaa cat ggc ata aat acc tcc tca ggg atc gta	672	
Phe Ala Asp Ser Leu Lys His Gly Ile Asn Thr Ser Ser Gly Ile Val		
210 215 220		
		30
tct gag tta att cat tcc aag gta ggt gga gaa ttt tat aat tac tgt	720	
Ser Glu Leu Ile His Ser Lys Val Gly Gly Glu Phe Tyr Asn Tyr Cys		
225 230 235 240		
ggc cca ttt att gac gtg cgt gac gtt tct aaa gcc cac cta gtt gca	768	
Gly Pro Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ser Lys Ala His Leu Val Ala		
245 250 255		40

att gaa aaa cca gaa tgt acc ggc caa aga tta gta ttg agt gaa ggt	816	
Ile Glu Lys Pro Glu Cys Thr Gly Gln Arg Leu Val Leu Ser Glu Gly		
260 265 270		
tta ttc tgc tgt caa gaa atc gtt gac atc ttg aac gag gaa ttc cct	864	
Leu Phe Cys Cys Gln Glu Ile Val Asp Ile Leu Asn Glu Glu Phe Pro		
275 280 285		10
caa tta aag ggc aag ala gct aca ggt gaa cct gcg acc ggt cca agc	912	
Gln Leu Lys Gly Lys Ile Ala Thr Gly Glu Pro Ala Thr Gly Pro Ser		
290 295 300		
ttt tta gaa aaa aac tct tgc aag ttt gac aat tct aag aca aaa aaa	960	
Phe Leu Glu Lys Asn Ser Cys Lys Phe Asp Asn Ser Lys Thr Lys Lys		20
305 310 315 320		
cta ctg gga ttc cag ttt tac aat tta aag gat tgc ata gtt gac acc	1008	
Leu Leu Gly Phe Gln Phe Tyr Asn Leu Lys Asp Cys Ile Val Asp Thr		
325 330 335		
gcg gcg caa atg tta gaa gtt caa aat gaa gcc taa	1044	30
Ala Ala Gln Met Leu Glu Val Gln Asn Glu Ala		
340 345		
<210> 17		
<211> 347		
<212> PRT		40
<213> Saccharomyces cerevisiae		

<400> 17

Met Thr Thr Asp Thr Thr Val Phe Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe Ile
 1 5 10 15

Ala Leu His Ile Met Asn Asp Leu Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Val Ile
 20 25 30

10

Gly Ser Gly Arg Ser Gln Glu Lys Asn Asp Gly Leu Leu Lys Lys Phe
 35 40 45

Asn Asn Asn Pro Lys Leu Ser Met Glu Ile Val Glu Asp Ile Ala Ala
 50 55 60

20

Pro Asn Ala Phe Asp Glu Val Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys
 65 70 75 80

Ile Val Leu His Thr Ala Ser Pro Phe His Phe Glu Thr Thr Asn Phe
 85 90 95

Glu Lys Asp Leu Leu Thr Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Ser Ile Leu
 100 105 110

30

Glu Ala Ile Lys Lys Tyr Ala Ala Asp Thr Val Glu Lys Val Ile Val
 115 120 125

Thr Ser Ser Thr Ala Ala Leu Val Thr Pro Thr Asp Met Asn Lys Gly
 130 135 140

40

Asp Leu Val Ile Thr Glu Glu Ser Trp Asn Lys Asp Thr Trp Asp Ser
 145 150 155 160

Cys Gln Ala Asn Ala Val Ala Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Phe Ala
 165 170 175

Glu Lys Thr Ala Trp Glu Phe Leu Lys Glu Asn Lys Ser Ser Val Lys
 180 185 190

10

Phe Thr Leu Ser Thr Ile Asn Pro Gly Phe Val Phe Gly Pro Gln Met
 195 200 205

Phe Ala Asp Ser Leu Lys His Gly Ile Asn Thr Ser Ser Gly Ile Val
 210 215 220

20

Ser Glu Leu Ile His Ser Lys Val Gly Gly Glu Phe Tyr Asn Tyr Cys
 225 230 235 240

Gly Pro Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ser Lys Ala His Leu Val Ala
 245 250 255

30

Ile Glu Lys Pro Glu Cys Thr Gly Gln Arg Leu Val Leu Ser Glu Gly
 260 265 270

Leu Phe Cys Cys Gln Glu Ile Val Asp Ile Leu Asn Glu Glu Phe Pro
 275 280 285

Gln Leu Lys Gly Lys Ile Ala Thr Gly Glu Pro Ala Thr Gly Pro Ser
 290 295 300

40

Phe Leu Glu Lys Asn Ser Cys Lys Phe Asp Asn Ser Lys Thr Lys Lys
 305 310 315 320

Leu Leu Gly Phe Gln Phe Tyr Asn Leu Lys Asp Cys Ile Val Asp Thr
 325 330 335

Ala Ala Gln Met Leu Glu Val Gln Asn Glu Ala
 340 345

10

<210> 18

<211> 44

<212> DNA

20

<213> Artificial

<220>

<223> an artificially synthesized primer sequence

<400> 18

cgagtcaiga ctactgagaa aaccgttggtg ttgtttctg gtgc

44

30

<210> 19

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial

40

<220>

(223) an artificially synthesized primer sequence

(400) 19

cgagctagca ttagctttta ctttgaactt ctagtaattg cgag

44

(210) 20

10

(211) 1047

(212) DNA

(213) *Saccharomyces cerevisiae*

(220)

(221) CDS

(222) (1)..(1044)

20

(223)

(400) 20

atg act act gaa aaa acc gtt gtt ttt gtt tct ggt gct act ggt ttc

48

Met Thr Thr Glu Lys Thr Val Val Phe Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe

1

5

10

15

30

att gct cta cac gta gtg gac gat tta tta aaa act ggt tac aag gtc

96

Ile Ala Leu His Val Val Asp Asp Leu Leu Lys Thr Gly Tyr Lys Val

20

25

30

atc ggt tcg ggt agg tcc caa gaa aag aat gat gga ttg ctg aaa aaa

144

Ile Gly Ser Gly Arg Ser Gln Glu Lys Asn Asp Gly Leu Leu Lys Lys

35

40

45

40

agt tgt caa gct aac gcg gtt tcc gca tac tgt ggt tcc aag aaa ttt 528

Ser Cys Gln Ala Asn Ala Val Ser Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Phe
 165 170 175

gct gaa aaa act gct tgg gat ttt ctc gag gaa aac caa tca agc atc 576
 Ala Glu Lys Thr Ala Trp Asp Phe Leu Glu Glu Asn Gln Ser Ser Ile
 180 185 190

aaa ttt acg cta tca acc atc aac cca gga ttt gtt ttt ggc cct cag 624
 Lys Phe Thr Leu Ser Thr Ile Asn Pro Gly Phe Val Phe Gly Pro Gln
 195 200 205

cta ttt gcc gac tct ctt aga aat gga ata aat agc tct tca gcc att 672
 Leu Phe Ala Asp Ser Leu Arg Asn Gly Ile Asn Ser Ser Ser Ala Ile
 210 215 220

att gcc aat ttg gtt agt tat aaa tta ggc gac aat ttt tat aat tac 720
 Ile Ala Asn Leu Val Ser Tyr Lys Leu Gly Asp Asn Phe Tyr Asn Tyr
 225 230 235 240

agt ggt cct ttt att gac gtt cgc gat gtt tca aaa gct cat tta ctt 768
 Ser Gly Pro Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ser Lys Ala His Leu Leu
 245 250 255

gca ttt gag aaa ccc gaa tgc gct ggc caa aga cta ttc tta tgt gaa 816
 Ala Phe Glu Lys Pro Glu Cys Ala Gly Gln Arg Leu Phe Leu Cys Glu
 260 265 270

gat atg ttt tgc tct caa gaa gcg ctg gat atc ttg aat gag gaa ttt 864
 Asp Met Phe Cys Ser Gln Glu Ala Leu Asp Ile Leu Asn Glu Glu Phe

10

20

30

40

275

280

285

cca cag tta aaa ggc aag ata gca act ggc gaa cct ggt agc ggc tca 912
 Pro Gln Leu Lys Gly Lys Ile Ala Thr Gly Glu Pro Gly Ser Gly Ser
 290 295 300

acc ttt ttg aca aaa aac tgc tgc aag tgc gac aac cgc aaa acc aaa 960 10
 Thr Phe Leu Thr Lys Asn Cys Cys Lys Cys Asp Asn Arg Lys Thr Lys
 305 310 315 320

aat tta tta gga ttc caa ttt aat aag ttc aga gat tgc att gtc gat 1008
 Asn Leu Leu Gly Phe Gln Phe Asn Lys Phe Arg Asp Cys Ile Val Asp
 325 330 335

act gcc tcg caa tta cta gaa gtt caa agt aaa agc taa 1047
 Thr Ala Ser Gln Leu Leu Glu Val Gln Ser Lys Ser
 340 345

(210) 21

(211) 348

(212) PRT

(213) *Saccharomyces cerevisiae*

(400) 21

Met Thr Thr Glu Lys Thr Val Val Phe Val Ser Gly Ala Thr Gly Phe
 1 5 10 15 40

Ile Ala Leu His Val Val Asp Asp Leu Leu Lys Thr Gly Tyr Lys Val
 20 25 30

Ile Gly Ser Gly Arg Ser Gln Glu Lys Asn Asp Gly Leu Leu Lys Lys
 35 40 45

Phe Lys Ser Asn Pro Asn Leu Ser Met Glu Ile Val Glu Asp Ile Ala
 50 55 60

10

Ala Pro Asn Ala Phe Asp Lys Val Phe Gln Lys His Gly Lys Glu Ile
 65 70 75 80

Lys Val Val Leu His Ile Ala Ser Pro Val His Phe Asn Thr Thr Asp
 85 90 95

20

Phe Glu Lys Asp Leu Leu Ile Pro Ala Val Asn Gly Thr Lys Ser Ile
 100 105 110

Leu Glu Ala Ile Lys Asn Tyr Ala Ala Asp Thr Val Glu Lys Val Val
 115 120 125

30

Ile Thr Ser Ser Val Ala Ala Leu Ala Ser Pro Gly Asp Met Lys Asp
 130 135 140

Thr Ser Phe Val Val Asn Glu Glu Ser Trp Asn Lys Asp Thr Trp Glu
 145 150 155 160

Ser Cys Gln Ala Asn Ala Val Ser Ala Tyr Cys Gly Ser Lys Lys Phe
 165 170 175

40

Ala Glu Lys Thr Ala Trp Asp Phe Leu Glu Glu Asn Gln Ser Ser Ile
180 185 190

Lys Phe Thr Leu Ser Thr Ile Asn Pro Gly Phe Val Phe Gly Pro Gln
195 200 205

Leu Phe Ala Asp Ser Leu Arg Asn Gly Ile Asn Ser Ser Ser Ala Ile
210 215 220

Ile Ala Asn Leu Val Ser Tyr Lys Leu Gly Asp Asn Phe Tyr Asn Tyr
225 230 235 240

Ser Gly Pro Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ser Lys Ala His Leu Leu
245 250 255

Ala Phe Glu Lys Pro Glu Cys Ala Gly Gln Arg Leu Phe Leu Cys Glu
260 265 270

Asp Met Phe Cys Ser Gln Glu Ala Leu Asp Ile Leu Asn Glu Glu Phe
275 280 285

Pro Gln Leu Lys Gly Lys Ile Ala Thr Gly Glu Pro Gly Ser Gly Ser
290 295 300

Thr Phe Leu Thr Lys Asn Cys Cys Lys Cys Asp Asn Arg Lys Thr Lys
305 310 315 320

Asn Leu Leu Gly Phe Gln Phe Asn Lys Phe Arg Asp Cys Ile Val Asp

10

20

30

40

325

330

335

Thr Ala Ser Gln Leu Leu Glu Val Gln Ser Lys Ser

340

345

(210)	22		10
-------	----	--	----

(211)	30		
-------	----	--	--

(212)	DNA		
-------	-----	--	--

(213)	Artificial		
-------	------------	--	--

(220)			
-------	--	--	--

(223)	an artificially synthesized primer sequence		
-------	---	--	--

20

(400)	22		
-------	----	--	--

gcaacaatgic taatacagtt ctagtttcig		30	
-----------------------------------	--	----	--

(210)	23		
-------	----	--	--

(211)	41		
-------	----	--	--

(212)	DNA		30
-------	-----	--	----

(213)	Artificial		
-------	------------	--	--

(220)			
-------	--	--	--

(223)	an artificially synthesized primer sequence		
-------	---	--	--

(400)	23		
-------	----	--	--

ggttctagat tataaacggt tctccttctt caaaatttgg g		41	40
---	--	----	----

(210) 24
 (211) 1035
 (212) DNA
 (213) *Saccharomyces cerevisiae*

(220) 10
 (221) CDS
 (222) (1)..(1032)
 (223)

(400) 24

atg tct aat aca gtt cta gtt tct ggc gct tca ggt ttt att gcc ttg 48
 Met Ser Asn Thr Val Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Phe Ile Ala Leu 20
 1 5 10 15

cat atc ctg tca caa ttg tta aaa caa gat tat aag gtt att gga act 96
 His Ile Leu Ser Gln Leu Leu Lys Gln Asp Tyr Lys Val Ile Gly Thr
 20 25 30

gtg aga tcc cat gaa aaa gaa gca aaa ttg cta aga caa ttt caa cat 144 30
 Val Arg Ser His Glu Lys Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln Phe Gln His
 35 40 45

aac cct aat tta act tta gaa att gtt ccg gac att tct cat cca aat 192
 Asn Pro Asn Leu Thr Leu Glu Ile Val Pro Asp Ile Ser His Pro Asn
 50 55 60

gct ttc gat aag gtt ctg cag aaa cgt gga cgt gag att agg tat gtt 240 40

Ala Phe Asp Lys Val Leu Gln Lys Arg Gly Arg Glu Ile Arg Tyr Val
65 70 75 80

cta cac acg gcc tct cct ttt cat tat gat act acc gaa tat gaa aaa 288
Leu His Thr Ala Ser Pro Phe His Tyr Asp Thr Thr Glu Tyr Glu Lys
85 90 95

gac tta ttg att ccc gcg tta gaa ggt aca aaa aac atc cta aat tct 336
Asp Leu Leu Ile Pro Ala Leu Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Asn Ser
100 105 110

atc aag aaa tat gca gca gac act gta gag cgt gtt gtt gtg act tct 384
Ile Lys Lys Tyr Ala Ala Asp Thr Val Glu Arg Val Val Val Thr Ser
115 120 125

tct tgt act gct att ata acc ctt gca aag atg gac gat ccc agt gtg 432
Ser Cys Thr Ala Ile Ile Thr Leu Ala Lys Met Asp Asp Pro Ser Val
130 135 140

gtt ttt aca gaa gag agt tgg aac gaa gca acc tgg gaa agc tgt caa 480
Val Phe Thr Glu Glu Ser Trp Asn Glu Ala Thr Trp Glu Ser Cys Gln
145 150 155 160

att gat ggg ata aat gct tac ttt gca tcc aag aag ttt gct gaa aag 528
Ile Asp Gly Ile Asn Ala Tyr Phe Ala Ser Lys Lys Phe Ala Glu Lys
165 170 175

gct gcc tgg gag ttc aca aaa gag aat gaa gat cac atc aaa ttc aaa 576
Ala Ala Trp Glu Phe Thr Lys Glu Asn Glu Asp His Ile Lys Phe Lys

10

20

30

40

180	185	190		
cta aca aca gtc aac cct tct ctt ctt ttt ggt cct caa ctt ttc gat			624	
Leu Thr Thr Val Asn Pro Ser Leu Leu Phe Gly Pro Gln Leu Phe Asp				
195	200	205		
 gaa gat gtg cat ggc cat ttg aat act tct tgc gaa atg atc aat ggc			672	10
Glu Asp Val His Gly His Leu Asn Thr Ser Cys Glu Met Ile Asn Gly				
210	215	220		
 cta att cat acc cca gta aat gcc agt gtt cct gat ttt cat tcc att			720	
Leu Ile His Thr Pro Val Asn Ala Ser Val Pro Asp Phe His Ser Ile				
225	230	235	240	
				20
 ttt att gat gta agg gat gtg gcc cta gct cat ctg tat gct ttc cag			768	
Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ala Leu Ala His Leu Tyr Ala Phe Gln				
245	250	255		
 aag gaa aat acc gcg ggt aaa aga tta gtg gta act aac ggt aaa ttt			816	
Lys Glu Asn Thr Ala Gly Lys Arg Leu Val Val Thr Asn Gly Lys Phe				
260	265	270		30
 gga aac caa gat atc ctg gat att ttg aac gaa gat ttt cca caa tta			864	
Gly Asn Gln Asp Ile Leu Asp Ile Leu Asn Glu Asp Phe Pro Gln Leu				
275	280	285		
 aga ggt ctc att cct ttg ggt aag cct ggc aca ggt gat caa gtc att			912	
Arg Gly Leu Ile Pro Leu Gly Lys Pro Gly Thr Gly Asp Gln Val Ile				40
290	295	300		

gac cgc ggt tca act aca gat aat agt gca acg agg aaa ata ctt ggc 960
 Asp Arg Gly Ser Thr Thr Asp Asn Ser Ala Thr Arg Lys Ile Leu Gly
 305 310 315 320

ttt gag ttc aga agt tta cac gaa agt gtc cat gat act gct gcc caa 1008
 Phe Glu Phe Arg Ser Leu His Glu Ser Val His Asp Thr Ala Ala Gln 10
 325 330 335

att ttg aag aag gag aac aga tta tga 1035
 Ile Leu Lys Lys Glu Asn Arg Leu
 340

<210> 25

<211> 344

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<400> 25

Met Ser Asn Thr Val Leu Val Ser Gly Ala Ser Gly Phe Ile Ala Leu
 1 5 10 15

His Ile Leu Ser Gln Leu Leu Lys Gln Asp Tyr Lys Val Ile Gly Thr
 20 25 30

Val Arg Ser His Glu Lys Glu Ala Lys Leu Leu Arg Gln Phe Gln His 40
 35 40 45

Asn Pro Asn Leu Thr Leu Glu Ile Val Pro Asp Ile Ser His Pro Asn
 50 55 60

Ala Phe Asp Lys Val Leu Gln Lys Arg Gly Arg Glu Ile Arg Tyr Val
 65 70 75 80

Leu His Thr Ala Ser Pro Phe His Tyr Asp Thr Thr Glu Tyr Glu Lys
 85 90 95

Asp Leu Leu Ile Pro Ala Leu Glu Gly Thr Lys Asn Ile Leu Asn Ser
 100 105 110

Ile Lys Lys Tyr Ala Ala Asp Thr Val Glu Arg Val Val Val Thr Ser
 115 120 125

Ser Cys Thr Ala Ile Ile Thr Leu Ala Lys Met Asp Asp Pro Ser Val
 130 135 140

Val Phe Thr Glu Glu Ser Trp Asn Glu Ala Thr Trp Glu Ser Cys Gln
 145 150 155 160

Ile Asp Gly Ile Asn Ala Tyr Phe Ala Ser Lys Lys Phe Ala Glu Lys
 165 170 175

Ala Ala Trp Glu Phe Thr Lys Glu Asn Glu Asp His Ile Lys Phe Lys
 180 185 190

Leu Thr Thr Val Asn Pro Ser Leu Leu Phe Gly Pro Gln Leu Phe Asp

10

20

30

40

195	200	205	
Glu Asp Val His Gly His Leu Asn Thr Ser Cys Glu Met Ile Asn Gly			
210	215	220	
Leu Ile His Thr Pro Val Asn Ala Ser Val Pro Asp Phe His Ser Ile			
225	230	235	240
			10
Phe Ile Asp Val Arg Asp Val Ala Leu Ala His Leu Tyr Ala Phe Gln			
245	250	255	
Lys Glu Asn Thr Ala Gly Lys Arg Leu Val Val Thr Asn Gly Lys Phe			
260	265	270	
			20
Gly Asn Gln Asp Ile Leu Asp Ile Leu Asn Glu Asp Phe Pro Gln Leu			
275	280	285	
Arg Gly Leu Ile Pro Leu Gly Lys Pro Gly Thr Gly Asp Gln Val Ile			
290	295	300	
Asp Arg Gly Ser Thr Thr Asp Asn Ser Ala Thr Arg Lys Ile Leu Gly			
305	310	315	320
			30
Phe Glu Phe Arg Ser Leu His Glu Ser Val His Asp Thr Ala Ala Gln			
325	330	335	
Ile Leu Lys Lys Glu Asn Arg Leu			
340			40

【図面の簡単な説明】

【図 1】 SDS-PAGE におけるパターンを示す図である。レーン 1 は分子量マーカー、レーン 2 は実施例 1 で得られた酵素を示す。

【図 2】 実施例 1 で得られた酵素の 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性の pH 依存性を示す図である。白丸は Britton and Robinson 広域 Buffer、白三角は酢酸-酢酸ナトリウム Buffer、黒丸はリン酸カリウム緩衝液を表す。

【図 3】 実施例 1 で得られた酵素の 3, 4-ジメトキシフェニルアセトン還元活性の温度 50

依存性を示す図である。

【図4】トルラスボラ・デルブレッキー由来のT d C R 1の一部を導入したプラスミド (p S E - T D X) の構築図である。

【図5】トルラスボラ・デルブレッキー由来のT d C R 1の一部を導入したプラスミド (p U C - T D X) の構築図である。

【図6】トルラスボラ・デルブレッキー由来のT d C R 1の一部を導入したプラスミド (p S G - T D X) の構築図である。

【図7】全T d C R 1遺伝子を含み、T d C R 1を発現可能なプラスミド (p S E - T D R 1) の構築図である。

【図8】グルコース脱水素酵素とT d C R 1を同時に発現可能なプラスミド (p S G - T D R 1) の構築図である。 10

【図9】サッカロマイセス・セレビジエ由来のY G L 1 5 7 w 遺伝子を導入したプラスミド (p S E - Y G P 7) の構築図。プラスミドのマッピング中で、Pはt r cプロモーターを、T (r r n B)はr r n B T 1 T 2ターミネーターを、ampはアンピシリン抵抗性を示すβ-ラクターゼ遺伝子を、oriはプラスミドの複製起源を、ropはR O P - p r o t e i n遺伝子を、laq I qはラクトースリプレッサーを表す。

【図10】サッカロマイセス・セレビジエ由来のY G L 1 5 7 w 遺伝子と枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を導入したプラスミド (p S G - Y G P 7) の構築図。プラスミドのマッピング中で、Pはt r cプロモーターを、T (r r n B)はr r n B T 1 T 2ターミネーターを、ampはアンピシリン抵抗性を示すβ-ラクターゼ遺伝子を、oriはプラスミドの複製起源を、ropはR O P - p r o t e i n遺伝子を、laq I qはラクトースリプレッサーを、B s G l c D Hは枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を表す 20

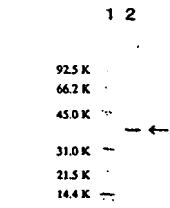
【図11】サッカロマイセス・セレビジエ由来のY G L 0 3 9 w 遺伝子を導入したプラスミド (p S E - Y G D 9) の構築図。プラスミドのマッピング中で、Pはt r cプロモーターを、T (r r n B)はr r n B T 1 T 2ターミネーターを、ampはアンピシリン抵抗性を示すβ-ラクターゼ遺伝子を、oriはプラスミドの複製起源を、ropはR O P - p r o t e i n遺伝子を、laq I qはラクトースリプレッサーを表す。

【図12】サッカロマイセス・セレビジエ由来のY G L 0 3 9 w 遺伝子と枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を導入したプラスミド (p S G - Y G D 9) の構築図。プラスミドのマッピング中で、Pはt r cプロモーターを、T (r r n B)はr r n B T 1 T 2ターミネーターを、ampはアンピシリン抵抗性を示すβ-ラクターゼ遺伝子を、oriはプラスミドの複製起源を、ropはR O P - p r o t e i n遺伝子を、laq I qはラクトースリプレッサーを、B s G l c D Hは枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を表す 30

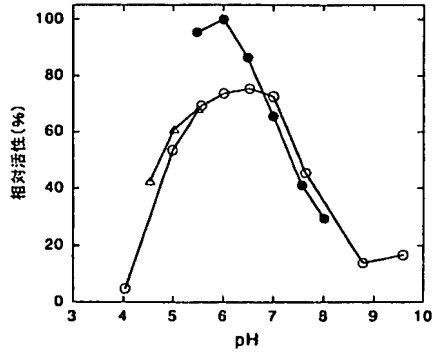
【図13】サッカロマイセス・セレビジエ由来のY D R 5 4 1 c 遺伝子を導入したプラスミド (p S E - Y D R 1) の構築図。プラスミドのマッピング中で、Pはt r cプロモーターを、T (r r n B)はr r n B T 1 T 2ターミネーターを、ampはアンピシリン抵抗性を示すβ-ラクターゼ遺伝子を、oriはプラスミドの複製起源を、ropはR O P - p r o t e i n遺伝子を、laq I qはラクトースリプレッサーを表す。 40

【図14】サッカロマイセス・セレビジエ由来のY D R 5 4 1 c 遺伝子と枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を導入したプラスミド (p S G - Y D R 1) の構築図。プラスミドのマッピング中で、Pはt r cプロモーターを、T (r r n B)はr r n B T 1 T 2ターミネーターを、ampはアンピシリン抵抗性を示すβ-ラクターゼ遺伝子を、oriはプラスミドの複製起源を、ropはR O P - p r o t e i n遺伝子を、laq I qはラクトースリプレッサーを、B s G l c D Hは枯草菌由来のグルコース脱水素酵素遺伝子を表す

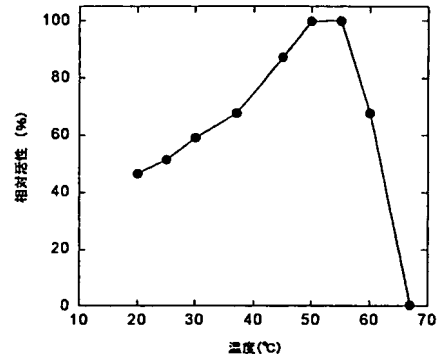
【図 1】



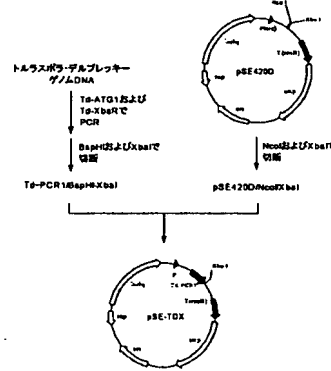
【図 2】



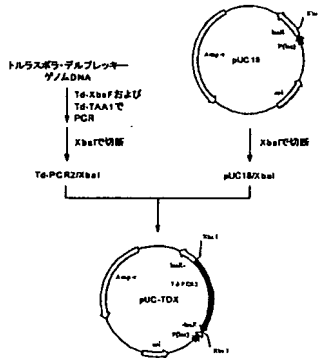
【図 3】



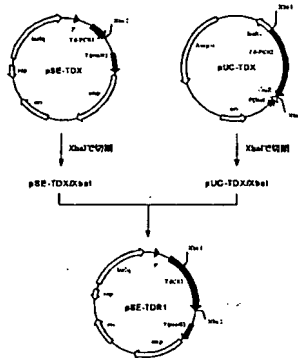
【図 4】



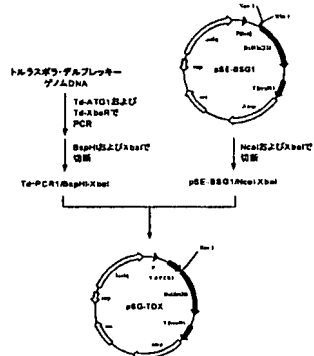
【図 5】



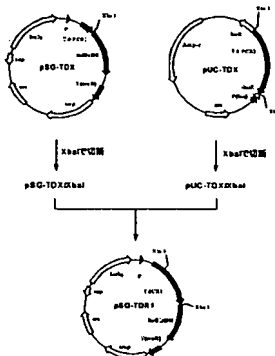
【図 7】



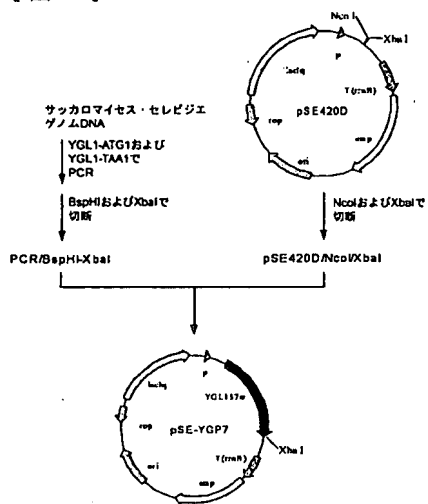
【図 6】



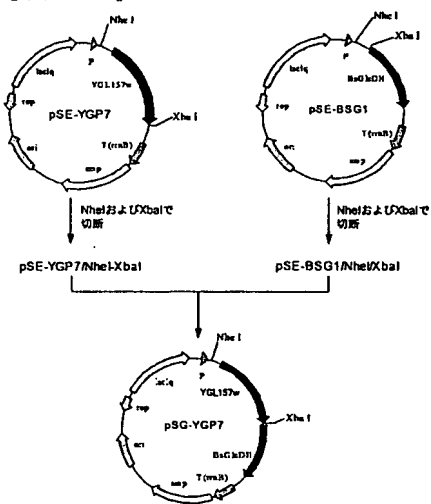
【図 8】



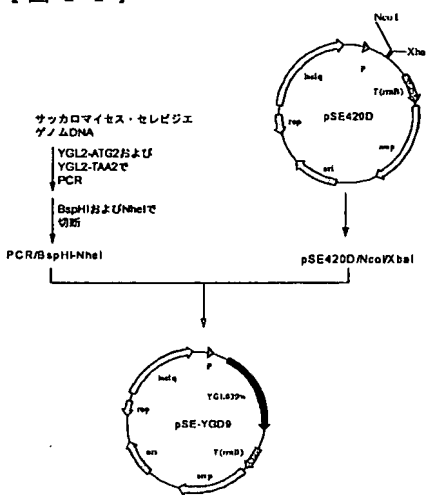
【図 9】



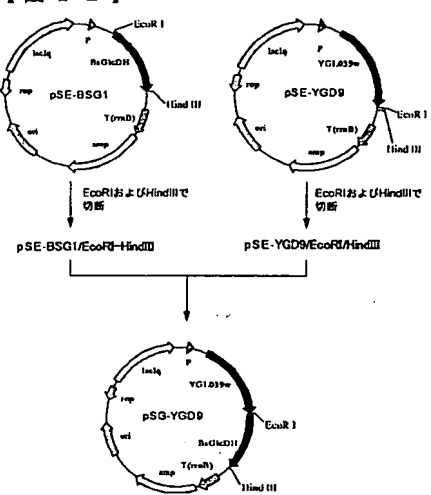
【図 10】



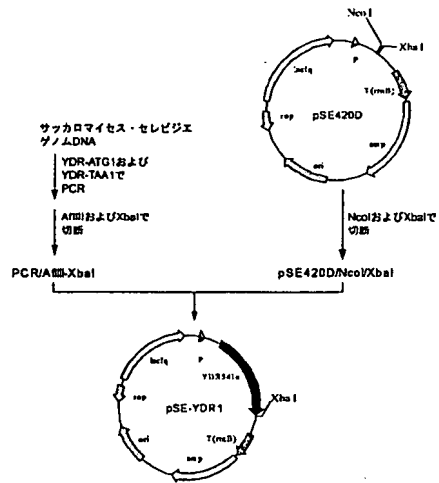
【図 11】



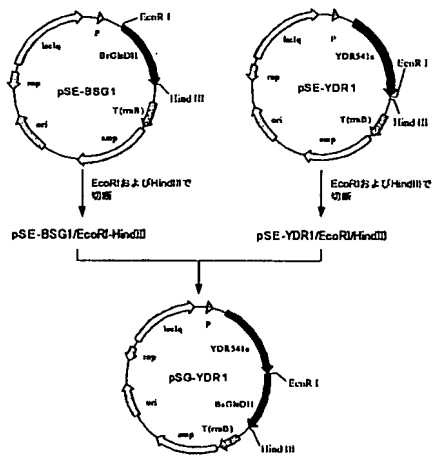
【図 12】



【図 13】



【図 14】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁷

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N 9/02

C 1 2 P 7/02

C 1 2 P 7/02

C 1 2 P 7/22

C 1 2 P 7/22

C 1 2 N 5/00

A

(72) 発明者 中島 賢則

茨城県つくば市千現 1-14-14-404

F ターム (参考) 4B024 AA01 AA03 BA08 BA80 CA01 DA01 DA02 DA05 DA06 DA11

EA04 GA11 HA08

4B050 CC01 CC03 DD02 EE10 LL05

4B064 AC17 CA02 CA05 CA06 CA10 CA11 CA19 CA21 CB18 CC24

CD05 DA01 DA20

4B065 AA01X AA19Y AA26X AA57X AA72Y AA80Y AA87X AB01 AC14 BA02

CA05 CA28